

点燃癫痫模型基因的差异表达及 草果知母汤对其影响

贺娟 甘贤兵 梁怡 王洪图

摘要 目的 筛选与点燃癫痫模型发病及草果知母汤发挥疗效相关联的基因。**方法** 使用 mRNA 基因差异显示技术(DDRT-PCR),筛选差异基因条带,并使用 Northern 印记杂交排除假阳性。**结果** 正常对照组、模型组、中药组存在 110 条差异条带,其中 11 条基因表达有明显差异的片段在正常对照组不存在,但出现在模型组,又在治疗组消失,说明这 11 条基因是与癫痫发病和治疗密切关联的基因。经 NCBI 美国国家基因库检索,这 11 条基因中的 7 条为同源基因,有 4 条基因片段为功能未知的新基因,其中 3 条新基因经 Northern 印记杂交排除了假阳性的可能,已经在 GeneBank 进行了注册,注册号分别 CK325391、CK325392、CK325393、CK325394。**结论** 草果知母汤可能通过影响海马组织部分基因片段的表达而起到治疗癫痫模型的作用。

关键词 差异显示;基因;点燃模型;癫痫;草果知母汤

Differential Expression and Influence of Caoguo Zhimu Decoction on Kindling Epilepsy Related Genes HE Juan, GAN Xian-bing, LIANG Yi, et al *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Abstract Objective To screen the relative genes associated with the genesis of kindling epilepsy and the effect of Caoguo Zhimu Decoction (CZD) on these genes. **Methods** mRNA differential display reverse transcription PCR was used to screen differential gene bind, and Northern blotting hybridization was applied to exclude the false positive reaction. **Results** There were as more as 110 differential expression bindings in the normal group, model group and the treated group, among them 11 binds with differential expression only appeared in the model group but not in the normal group and disappeared in the treated group. It indicated that the 11 genes are correlated with the genesis and treatment of kindling epilepsy. By searching in the Gene-bank of NCBI, 7 bindings of the 11 were homologous genes and 4 gene fragments are novel genes with unknown function, which have been registered at the Gene-bank, with the registered numbers of CK325391, CK325392, CK325393, CK325394, respectively, and false positive possibility of 3 novel genes was excluded. **Conclusion** CZD has effect in treating kindling epilepsy may be through influencing the expression of partial gene fragments in the hippocampus.

Key words differential display; gene; kindling model; epilepsy; Caoguo Zhimu Decoction

癫痫作为一发病率较高的脑部疾病,其发病机制虽然在研究领域进行过多方面的探索,但确切的原因一直不甚清晰。鉴于癫痫症状的长期慢性存在,癫痫生物体基因表达的改变应是其根本的生物学基础,因此,本实验利用目前先进的基因差异表达(DD)技术,观察慢性点燃癫痫模型 mRNA 表达的改变,从而筛选与癫痫发病和痊愈密切相关的基因条带,探讨癫痫形成与恢复的分子机制。同时选用对癫痫有较好疗效的草果知母汤作为药物对照,以期对与癫痫的痊愈密切

关联的基因进行探索与筛选。

材料与方 法

1 实验动物 同窝生 SD 大鼠 6 只,出生 2 周与母鼠分窝,饲养至 1 月龄大小,体重 120 g 左右,进行分组。

2 试剂与仪器 戊四唑(PTZ),美国 Sigma 公司产品;RNA 提取试剂盒,逆转录试剂盒,扩增试剂盒,均为美国 Invitrogen 公司;dh5 \times 感受态细胞,美国博大泰克公司;质粒提取试剂盒, TapDNA 聚合酶, PMD18-T 载体,美国 Promega 公司, A1460; EcoR I、Hind III, 日本宝生物公司; 2400 PCR 仪,美国 PE 公司; GenomylsLRs 差异显示系统,美国 Beckman Coulter

基金项目:国家中医药管理局 211 重点项目(No. 200103)

作者单位:北京中医药大学(北京 100029)

通讯作者:贺娟, Tel: 010-64287011, E-mail: hejuan6428@sina.

公司;3700 测序仪,美国 ABI 公司。

3 引物设计 使用中科院微生物所设计的 1-12 号随机引物(加 M13 反转录子)作为 5' 端引物,锚定引物 T7-T12M(T7 为 T7 启动子,M 为 A、G、C)为 3' 端引物,在进行扩增时,在锚定引物上加入荧光标记物。

4 点燃癫痫模型的建立 造模方法:按亚惊厥量的 PTZ(戊四唑,pentylenetetrazol)32 mg/kg 给予大鼠腹腔注射,每天 1 次,持续 28 天。停药 7 天后,用同样的剂量进行点燃,每天 1 次,连续 5 天。凡连续 5 次达到 2 级以上惊厥,或 2 次 5 级以上惊厥者,为达到点燃标准。大鼠行为惊厥评分标准,参照文献^[1]的方法。

5 中药液的制备 草果知母汤由草果 12 g 知母 12 g 黄芩 12 g 厚朴 8 g 白芍 12 g 等 12 味中药组成,均为市售常用药品,经鉴定后使用。使用醇提法,将药液浓缩为 1 g/ml 的浓度,冰箱冷存待用。

6 动物的分组及处理 将 6 只 SD 大鼠取 5 只进行造模,另 1 只作为正常对照组。选达到点燃标准的大鼠 5 只,随机分为模型组和中药组,模型组 2 只,中药组 3 只。正常对照组、模型组均双蒸水灌胃每天 2 ml/kg;中药组草果知母汤醇提液灌胃每天 5 g/kg。

用药前测定动物的反应级别,用药 28 天后,用相同剂量的 PTZ 点燃,测定反应级别,并与用药前进行比较。结果如下:正常对照组 1 只,在治疗前后均为 0 级;模型组 2 只,在治疗前后均为 6 级;中药组 3 只,在治疗前均为 6 级,在治疗后 2 只为 0 级,1 只为 5 级。选取正常对照组 1 只,模型组 2 只,中药组降为 0 级的 2 只,进行下面的实验。将动物处死,取大鼠海马组织。

7 总 RNA 的提取 5 个大鼠海马组织,1# 为正常对照组,2# 为模型组 2 只合并,3# 为中药组 2 只合并,用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步抽提法提取总 RNA,用 Rnase-free Dnase I 除去其中污染的 DNA,经甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性,并以紫外分光光度计检测其纯度。

8 逆转录反应(RT-PCR) 选择锚定引物 T7T12AP1#,4#,8#,以总 RNA 为模板进行逆转录反应,每管反应体系及过程如下:总 RNA 4 μ l,AP 2 μ l,H₂O 6 μ l,混合,70 $^{\circ}$ C 5 min,冰上放置 3 min,加入溶液 I 12 μ l,5 \times buffer 4 μ l, DTT 1 mol 2 μ l,250 μ NTPmix(1:1:1:1)SuperScriptII 0.2 μ l。反应条件为 25 $^{\circ}$ C 5 min,42 $^{\circ}$ C 10 min,50 $^{\circ}$ C 60 min,0 $^{\circ}$ C 15 min。

9 cDNA 的扩增 选取与逆转录引物序列相同的带荧光标记的锚定引物,并选用 1#、2#、3# 3 条随

机引物,以逆转录产物 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。反应体系如下 cDNA 2 μ l,10 \times buffer1 μ l,Mg²⁺ (50 μ m)1 μ l,dNTPmix(1:1:1:1)2 μ l,TMR-AP(1#、4#、8#)1 μ l,Arbitrary Primer(1#、2#、3#)1 μ l,Tap polymerase 0.2 μ l, H₂O 1.8 μ l。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 15 s,0 $^{\circ}$ C 30 s,共进行 4 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,共 30 个循环。

10 荧光标记差异显示 PCR(DD-PCR) 配置 5.6% 的变性聚丙烯凝胶,胶厚 250 μ m,大小 61 cm \times 33 cm。将 8 μ l PCR 产物加 4.0 μ l 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性后上样。3 000 V、100 W、58 $^{\circ}$ C 电泳 4.5 h。干胶、洗胶,重复 3 次,干胶后置于 Genomyx SC 扫描,用系统所带的 Acquire SC program 软件分析处理扫描结果,找出差异条带差异条带。

11 回收差异条带并进行再扩增 用 Acquire SC program 软件将选定的差异条带定位,用一次性手术刀片切割下所需条带,置于 20~30 μ l TE 溶解液中,37 $^{\circ}$ C 水浴 30~60 min,备用。扩增体系和反应条件与 9 相同。将上述 PCR 扩增产物以摩尔比 3:1 连接到 PMD18-T vector 上,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将 5 μ l 连接反应液加入 50 μ l 感受态细胞中,冰浴 45~60 min。37 $^{\circ}$ C 倒置培养 10~16 h。

12 质粒 DNA 的提取与酶切鉴定 按美国 promega 生物公司的 A 1460 试剂盒说明书操作,方法为碱裂解法。PMD-18T vector 的内切酶为 EcoR I 和 Hind III,所用缓冲液类型均为 Hind III buffer,将提取的质粒置入 37 $^{\circ}$ C 的内切酶中消化 3 h,而后将酶切产物进行电泳,所得片段大小与 DD 图基本一致。

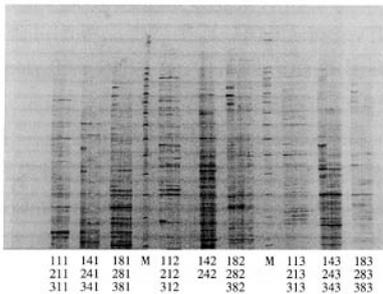
13 测序 送上海博雅测序公司测序。

14 Northern 印记杂交 选正常对照组和模型组的海马 RNA 各 10 μ g,加入分离液,进行电泳 4 h,而后将胶转移到尼龙膜上,并继续转移至含亚甲蓝溶液的玻璃器皿中染色 5 min。在 20 ml 预杂交液中 68 $^{\circ}$ C 温育膜 2 h,100 $^{\circ}$ C 加热 P 标记的双链 DNA 5 min,使之变性,迅速转移至冰水中冷却,把变性的放射性标记的探针直接加到预杂交液中,在合适的温度下继续温育 16 h,将膜转移到另一含有 0.1% 的 SDS 的 0.5 \times SSC 的塑料盒中,在印记纸上晾干膜,然后在 -70 $^{\circ}$ C 条件下,在含增感屏的暗盒内,对 X 光片(Kodak XAR5 胶片)放射自显影 48 h。

结 果

1 mRNA 差异显示结果 见图 1。本实验对点

燃癫痫模型大鼠海马 mRNA 的表达进行差异显示研究,观察了 PTZ 致痫、草果知母汤抗癫痫状态下海马组织 mRNA 表达的差异性。如图 1 所示,正常对照组、模型组、中药组 3 组 mRNA 的表达存在差异者共有 111 条,其表达存在以下几种特点:(1)一部分基因在正常对照组存在,但在模型组和中药组消失,这部分基因片段共有 68 条,说明长期使用 PTZ 导致了部分基因的损伤;(2)部分基因在正常对照组存在,在模型组消失,但在中药组出现,说明草果知母汤促进了 PTZ 所损伤部分基因的修复,这一部分基因有 4 条;(3)一部分基因在正常对照组不存在,但出现在模型组和中药组,说明戊四唑的使用导致了某种基因的表达,是癫痫模型相关基因,这一部分基因有 28 条;(4),一部分基因在正常对照组不存在,但出现在模型组,又在中药组消失,这一部分基因既与癫痫的发病相关联,又与草果知母汤治疗作用的发挥有关系,是癫痫发病和草果知母汤抗癫痫的候选基因。这一部分基因共有 11 条,分别为 3#、4#、5#、6#、15#、16#、36#、40#、46#、92#、103#,将作为进一步研究的对象。



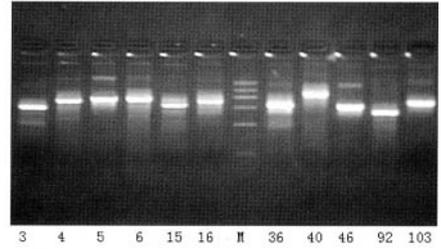
注: 每组编号第 1 个编号 1,2,3 分别代表正常对照组、模型组、中药组的 mRNA,中间的 1、4、8 分别为 1#、4#、8# 锚定引物,最后的 1、2、3 分别为 1#、2#、3# 随机引物

图 1 mRNA 差异显示结果

2 差异条带的扩增结果 回收在模型组存在但在正常对照组和中药组不存在的 11 条差异条带,其长度在 350~650 bp 之间,作为癫痫发病和草果知母汤抗癫痫的相关基因进行深入研究。先回收此 11 个条带,进行 PCR 扩增,其扩增产物进行聚丙烯酰胺电泳,如图 2 所示,条带清晰,说明回收及扩增纯度较好。

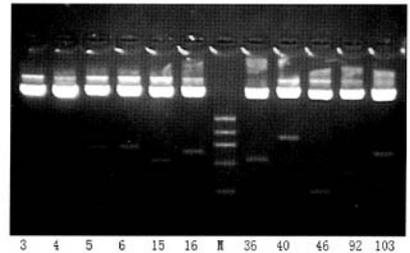
3 扩增条带进行质粒转染酶切结果 经质粒转染扩增后,用 EcoR I 和 Hind III 进行酶切,而后将酶切产物进行电泳,如图 3 所示,所得片段大小与 DD 图、PCR 扩增图基本一致。

4 序列分析 将酶切产物进行电泳后的条带回收,经 DNA 测序分析其产物,所得 11 条 mRNA 序列



注:M 为分子量标准,从上到下的大小依次是 1 200、900、700、500、300、100 bp

图 2 PCR 扩增电泳图

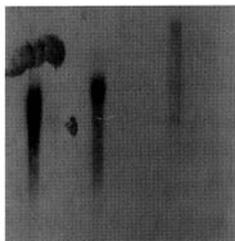


注:质粒用 EcoRI/HindIII 双切,走 2% 琼脂糖凝胶;M 为分子量标准,从上到下的大小依次是 1 200、900、700、500、300、100 bp

图 3 质粒酶切电泳图

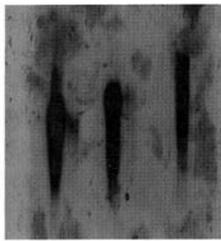
结果显示,各条序列的两端均为 T7 启动子和 M13 反转录因子的互补序列,经 NCBI 美国国家基因库检索,其中 3# 序列与位于鼠染色体 8q31 位置的核糖体蛋白(ribosomal protein S25)的基因有 97% 的同源性,5# 序列与鼠染色体 15p12 位置的神经元肿瘤抗原(paraneoplastic antigen MA2)有 99% 的同源性,6# 序列与鼠染色体 4q22 位置的甘油二酯酶(diaclyglycerol kinase iota-1) 100% 同源,40# 序列与位于鼠染色体 xq37 位置的 FMR2 蛋白(FMR2 protein)有 99% 的同源性,46# 序列与位于果蝇染色体 11p11 位置的交叉同族体 1(roundabout homolog 1)有 99% 的同源性,103# 序列与位于鼠染色体 4q22 位置的 s-腺甘半胱氨酸水解酶(S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase) 99% 同源,36# 虽然与大鼠所已测定的基因序列的某个片段有同源性,但为功能尚未研究的片段。其他 4#、15#、16#、92# 基因片段同源性较低,为功能未知的新基因,已经在 GeneBank 进行了注册,基因登记号和注册号分别为:CK325391, CK325392, CK325393,CK325394。

5 Northern 印记杂交 本研究选取 15#、16#、92# 3 个 cDNA 片段进行了模型组和对照组各海马组织 RNA 的杂交,并以 mRNA 的 18s 作为阳性对照,在



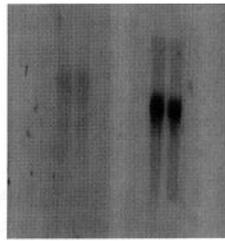
92#(M,N) 15#(M,N) 16#(M,N)
注:M,N 代表不同的碱基

图 4 杂交 24h 的反应状况



92#(M,N) 15#(M,N) 16#(M,N)

图 5 杂交 48h 的反应状况



24h(M, N) 48h(M, N)

图 6 18s 的阳性对照

24h(图 4)和 48h(图 5)的杂交条带曝光结果如图 6 所示。结果表明,在两个时间点,模型组的 3 个条带均存在着阳性反应,而正常对照组则反应为阴性;作为阳性对照的 mRNA18s,在正常对照组和模型组均存在阳性反应(图 6)。从而证实本研究所发现的此 3 个条带,均为阳性。

讨 论

DDRT-PCR 是 1992 年由 Liang 和 Pardec 创立的一种鉴定与克隆哺乳动物正常生理状态与病理状态之间差异表达基因的方法^[1],由于此技术具有其他研究基因表达技术所无法比拟的优势,如仅需要少量的 mRNA;能定性、定量检测细胞或组织 mRNA 的表达;在发现新基因方面灵敏性好等,因此,首次报道后,即迅速的被广泛应用于生物医学领域。

但是,本技术也存在一些缺陷,诸如 cDNA 的质量较低,在序列胶中往往呈不清晰状态;所得差异片段的假阳性高,可达 85% 等。本实验针对上述问题在操作过程中进行了改进,除使用双碱基锚定引物,减少每一条引物产生的第一条 cDNA 的数量,使差异显示时“重叠带”减少;增加引物长度,提高复性温度,提高扩增产物的特异性外,还采用以下两种方法:(1)将荧光物质标记于锚定引物的 5' 端,可产生清晰、明亮、低背景的分辨效果,操作周期仅 2 天,从而避免了同位素标记曝光时间长、带型不佳、不方便定位、易污染等缺点;(2)在锚定引物的 5' 端和随机引物的 3' 端分别增加 T7 (22mer)和 M13r(24mer)序列,此两种序列分别来自原核生物,可尽可能的降低真核 mRNA 序列中非特异性扩增的机会,因此,减少了假阳性的可能^[2]。

慢性点燃癫痫模型是反复地给予动物一种阈下的电或化学刺激,当刺激积累到一定程度,便转化为一种阈上的电发放效应,在相同的刺激下,引起癫痫发作,点燃一旦形成便终身携带^[3]。因此此模型最大程度的

模拟了人类癫痫的发病过程,因此,被认为是研究癫痫发病机理最理想的动物模型。此模型的慢性形成过程以及终身携带的特点,暗示其必然存在基因表达的改变。因此,通过分析其基因表达,对认识癫痫形成的内在机制将有重要意义。在使用 DDRT-PCR 研究癫痫模型基因的差异表达方面,先后有人研究了快速电点燃、马桑内酯点燃、先天性癫痫易感 E1 大鼠以及先天性失神发作癫痫鼠的基因差异表达^[4-7],但据我们所知,PTZ 慢性点燃癫痫模型的差异表达,尚未有研究。

本研究利用 DDRT-PCR 检测出 7 条与癫痫发病和草果知母汤治疗有明显关联的已知基因,其中核糖体蛋白是由复杂的蛋白和 rRNA 组成的酶系统,据既往的研究,许多风湿性疾病如系统性红斑狼疮、白塞氏病(眼、口、生殖器三联症)出现的严重中枢神经系统症状,如器质性脑综合征、癫痫等,常与核糖体蛋白有密切关系^[8]。核糖体蛋白与癫痫的关系在过去的文献资料中有一定的涉及,但一直未有资料明确证实其参与癫痫的发病,本实验结果证实,核糖体蛋白或 rRNA 不仅与癫痫发病密切相关,而且其表达的降低可以对癫痫的治疗有重要的作用。

FMR2 是与脆性 X 综合征相关联的基因,脆性 X 综合征是一种以智力障碍表现为主的 X 连锁遗传病,该病与位于 Xq27 处的一个对叶酸敏感的脆性位点有关,据 Moore SJ 等报道,有 4 例脆性 X 综合征患者,其精神发育迟滞、癫痫较其他的同类患者严重,发现其基因存在 FMR1 和 FMR2 的共同缺失^[9];Timms KM 分析了严重的 Hunter 综合征患者的基因类型,发现有严重癫痫症状患者的基因序列存在 FMR2 片段的删除^[10]。而本研究则发现了与既往的研究不同的结果,即 FMR2 表达的上调参与癫痫模型的形成,而其表达的降低则与癫痫的痊愈相关,其在本研究中呈现的变化,对癫痫发病机理和治疗的深入具有重要意义。

甘油二酯酶 I(DGKI)是在细胞信号的转换过程

中促进第二信使物质甘油二酯磷酸化并转化为磷脂酸的一种酶。其基因表达与疾病的相关性研究目前进行的较少, Sommer W 等首先研究发现 DGKI 与遗传性酗酒有关^[11], 但其与癫痫的关系则未见报道。本实验研究揭示其不仅与癫痫发病有密切关系, 而且与癫痫的治疗亦有极大相关性。

S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶(SAH)是生物体内广泛存在的一种酶, 能可逆性地催化 S-腺苷-L-高半胱氨酸, 将其分解为腺苷和高半胱氨酸, 具有多种生物学效应。以前对其临床功能的研究多集中在抗病毒的效应上。其与癫痫的关系, Mita T 等对先天性遗传性癫痫 E1 小鼠的基因建立了 cDNA 文库, 并对其进行了序列分析, 发现 E1 小鼠的基因序列中出现与大鼠的 SAH 同源的基因, 并且呈现多态性^[12]。根据本实验研究结果, SAH 不仅在点燃癫痫模型组呈高表达, 而且在中药组表达降低, 说明其在癫痫发病和恢复中的作用不容忽视。

同时, 本研究发现的 4 条新基因条带中有 3 条经 Northern 印记杂交得以证实, 其功能有待于进一步研究。

在过去的研究中, 我们在“脾胃转枢为五脏藏神的关键”理论指导下, 选用草果知母汤作为治疗癫痫的基本方, 证实草果知母汤对各种类型的癫痫模型均有明显的拮抗作用, 并能改变脑内多种神经递质及受体的含量和活性^[13]。本研究进一步证实, 草果知母汤能从海马组织的基因表达层面对点燃癫痫产生影响, 说明草果知母汤有从基因水平治疗癫痫的生物学基础。

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967—971
- 2 王 夏. 快速、有效筛选新的功能基因——荧光差异显示技术. *微生物学通报* 2003;30(1):103—105.
Wang X. Rapid and efficient screening for novel functional genes——Fluorescence differential display technology. *Microbiology A* 2003;30(1):103—105.
- 3 McNamara JO. Development of new pharmacological agents

- for epilepsy: lessons from the kindling model. *Epilepsia* 1989; 30(Suppl 1):S13—18.
- 4 Liang D, Seyfried TN. Genes differentially expressed in the kindled mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;96(1—2): 94—102.
- 5 朱和明, 朱长庚, 孟祥文. 新的癫痫相关基因的筛选及部分 cDNA 序列的分离鉴定. *同济医科大学学报* 1997;26(6): 426—429.
Zhu HM, Zhu CG, Meng XW. Screening of epilepsy-related genes and isolation and identification of cDNA. *J Tongji Med Univ* 1997;26(6):426—429.
- 6 Lakaye B, Borman B, Minet A, et al. Increased expression of mRNA encoding ferritin heavy chain in brain structures of a rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol* 2000;162(1): 112—120.
- 7 Babity JM, Armstrong JN, Plumier JC, et al. A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(6):2638—2641.
- 8 Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, et al. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1991; 351(6323):236—239.
- 9 Moore SJ, Strain L, Cole GF, et al. Fragile X syndrome with FMR1 and FMR2 deletion. *J Med Genet* 1999;36(7):565—566.
- 10 Timms KM, Bondeson ML, Ansari-Lari MA, et al. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997;6(3):479—486.
- 11 Sommer W, Arlinde C, Caberlotto L, et al. Differential expression of diacylglycerol kinase iota and L18A mRNAs in the brains of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Mol Psychiatry* 2001;6(1):103—108.
- 12 Mita T, Kawazu I, Hirano H, et al. E1 mice epilepsy shows genetic polymorphism for S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Neurochem Int* 2001;38(4):349—357.
- 13 王洪图, 贺 娟, 翟双庆, 等. 脾胃转枢对五脏藏神调节的研究述评. *北京中医药大学学报* 2002;25(2):1—4.
Wang HT, He J, Zhai SQ, et al. The review of revolution of spleen-stomach adjust the five internal organs storing spirit. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* 2002;25(2):1—4.

(收稿:2005-02-05 修回:2005-06-05)