

小鼠卡英酸颞叶癫痫慢性发作期的磷酸化蛋白组学研究

孙智明¹, 陈倩¹, 李明华¹, 马维宁², 赵旭阳^{1,3,Δ}, 黄卓^{1,Δ}

(1. 北京大学药学院分子与细胞药理学系 天然药物与仿生药物国家重点实验室 系统生物医学研究所, 北京 100191; 2. 中国医科大学附属盛京医院神经外科, 沈阳 110000; 3. 北京大学基础医学院北京肿瘤系统生物学重点实验室, 北京 100191)

[摘要] **目的:** 探究小鼠颞叶癫痫慢性发作期蛋白质功能和信号通路的改变。**方法:** (1) 制备小鼠卡英酸颞叶癫痫模型, 行为学达到 Racine 分级 4 分判定为造模成功。28 d 后, 取对照组和实验组小鼠海马组织进行磷酸化蛋白组学实验; (2) 选取检出密度大于 10^6 的数据进行统计分析; (3) 利用 GO (Gene Ontology) 数据库、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库和 STRING 数据库对磷酸化蛋白组学数据进行统计分析; (4) 结合文献对组学结果进行分析。**结果:** (1) 质谱共检测出 12 697 个蛋白质磷酸化位点, 其中 159 个位点变化差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); (2) 在蛋白质功能层面, 磷酸化水平显著性变化的蛋白质的分子功能主要是结合 (39.5%) 和催化活性 (35.7%), 这些蛋白质参与细胞交流 (20.8%)、初级代谢和含磷酸盐化合物代谢等生化过程; (3) 在信号通路层面, 这些蛋白质参与 10 条信号转导通路, 包括谷氨酸能突触信号通路、Ras 信号通路、长时程增强信号通路等; (4) 在蛋白质相互作用层面, 这些蛋白质形成以 Grin1 和 Dlg3 为核心, 以 Arhgef 2、Arhgap33 和 Tiam1 为核心与以 Spnb1/3/4、Add3 和 Ank2 为核心的蛋白质相互作用网; (5) 磷酸化蛋白组学数据显示, Grin1、Arhgef2、Arhgap33、Tiam1、Sptbn1/2/4 和 Ank2 等磷酸化水平在癫痫慢性发作期显著升高。**结论:** 磷酸化蛋白组学的结果从蛋白质功能、信号通路和蛋白质相互作用 3 个层面阐明了小鼠颞叶癫痫慢性发作期海马体蛋白质的变化, 验证了磷酸化蛋白组学研究的可靠性, 并提示多巴胺功能和 Kir3.1 钾通道功能可能与癫痫发生相关。

[关键词] 磷酸化蛋白组学; 颞叶癫痫; 癫痫发生

[中图分类号] R393 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2019)02-0197-09

doi: 10. 19723/j. issn. 1671-167X. 2019. 02. 001

Chronic phosphoproteomic in temporal lobe epilepsy mouse models induced by kainic acid

SUN Zhi-ming¹, CHEN Qian¹, LI Ming-hua¹, MA Wei-ning², ZHAO Xu-yang^{1,3,Δ}, HUANG Zhuo^{1,Δ}

(1. Institute of Systems Biomedicine, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Peking University School of Pharmaceutical Science, Beijing 100191, China; 2. Department of Neurosurgery, Sheng Jing Hospital affiliated to China Medical University, Shenyang 110000, China; 3. Beijing Key Laboratory of Tumor Systems Biology, Peking University School of Basic Medical Science, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate functions of proteins and signaling pathways involved in epileptogenesis during the chronic stage of temporal lobe epilepsy in mouse models. **Methods:** Kainic acid-induced temporal lobe epilepsy models were conducted, when reaching stage 4 using racine scale, the mice of experimental group were supposed to be successfully established. Pentobarbital sodium was injected to stop epileptic seizure in case of death. Twenty-eight days after the kainic acid injection, when the experimental group generally turned into chronic spontaneous seizures, mice hippocampal tissues were extracted from the control and the experimental groups respectively for phosphoproteomic. Enriched phosphorylated proteins were detected using mass spectrometry, only the proteins whose density was greater than 10^6 were analyzed by matching the Gene Ontology (GO) database, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database and STRING database to detect proteins involved in epileptogenesis in protein functions, signaling pathways and protein-protein interaction respectively. After that, literatures were reviewed about the key proteins. **Results:** (1) Total of 12 697 phosphorylation sites of enriched proteins were detected by mass spectrometry, and there were 159 sites whose phosphorylation levels were significantly different from the control ($P < 0.001$). (2) GO database showed that 35.7% of the 159 sites

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2015CB559200) 和国家自然科学基金 (81371432, 31400695) Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2015CB559200) and National Science Foundation of China (81371432, 31400695)

Δ Corresponding author's e-mail, huangz@hsc.pku.edu.cn, zhao-xu-yang@163.com

网络出版时间: 2019-3-11 9:28:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190308.1506.004.html>

were about “catalytic activity”, 39.5% were about “binding” and 20.8% were about “cell communication”, and the 159 proteins also participated in many biological processes, such as “primary metabolic process” “response to stimulus” “developmental process” “localization” and “phosphate-containing compound metabolic process”. (3) KEGG database showed that the 159 protein sites mainly involved in 10 signaling pathways: glutamatergic synapse, Ras signaling pathway, African trypanosomiasis, Cocaine addiction, Circadian entrainment, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Long-term potentiation, Endocytosis, Gap junction, Nicotine addiction. (4) STRING database showed that the protein-protein interaction network formed by the 159 proteins was focused on Grin1/Dlg3, Arhgef 2/Arhgap33/Tiam1 and Sptbn1/3/4/Add3/Ank2 protein group respectively. (5) Phosphorylation levels of Grin1, Arhgef 2, Arhgap33, Tiam1, Sptbn1/2/4 and Ank2 in experimental group were significantly higher than in the control ($P < 0.001$). **Conclusion:** Phosphoproteomic illustrated integral distribution of phosphorylated proteins at the chronic stage of temporal lobe epilepsy in the mouse model. Literatures showed that most key proteins were closely related to epileptogenesis, suggesting that some proteins or signaling pathways may play a role in epileptogenesis, such as dopamine and Kir3.1.

KEY WORDS Temporal lobe epilepsy; Phosphoproteomic; Epileptogenesis

癫痫是一种严重影响人类健康的慢性神经系统疾病,我国癫痫患病率为 0.7%,癫痫患者众多^[1]。癫痫病发作时患者会出现抽搐、肌肉僵直等症状,并常伴有意识消失,容易引起摔伤、车祸、溺水等意外事故,发生突然意外死亡的风险比正常人群高 20 倍^[2]。如果癫痫发作得不到有效控制,还会引起发作频率增加和神经元死亡,导致患者认知功能障碍。另外,患者反复的癫痫发作、社会歧视、长期服药等情况使其个人及家属承受着沉重的心理和社会负担。国内研究显示,43.5% 的癫痫患者合并抑郁,28.5% 的患者合并焦虑^[3]。

癫痫的危害极大,但癫痫的治疗效果仍不理想。目前有 30 余个抗癫痫药物上市,这些抗癫痫药物主要通过增强抑制性离子通道活性[如 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受体和 KCNQ 钾离子通道]或抑制兴奋性离子通道的活性(如钠通道、钙通道等)来降低神经元兴奋性,对癫痫症状进行控制^[4]。25% ~ 40% 的患者在现有药物治疗下癫痫发作仍得不到有效控制,转变为药物治疗无效的难治性癫痫^[5]。

颞叶癫痫是难治型癫痫中最常见的一种,主要由脑外伤、中风、感染、脑部肿瘤等原因引起。颞叶癫痫原发于脑颞叶,患者患病通常会经历创伤期、潜伏期和慢性发作期 3 个阶段。创伤期是癫痫诱因发生的时期,此后,患者通常经历 1 ~ 2 年没有癫痫发作的潜伏期,随后患者会经历反复发作的癫痫持续状态,称之为慢性发作期,大部分患者处于该阶段。一些新型抗癫痫药物,如醋酸艾司利卡西平(eslicarbazepine acetate, ESL)能够控制颞叶癫痫患者癫痫发作的比例仅为 25.3%^[6]。颞叶癫痫治疗困难,在颞叶癫痫慢性发作期找到新的治疗靶点,探究颞叶癫痫的发病机制,对颞叶癫痫进行干预和治疗十分迫切。

磷酸化蛋白组学是一种新兴的疾病研究策略,它是蛋白组学的分支,基于蛋白分离、质谱和生物信息学技术进行研究,能够从整体上观察细胞或组织中蛋白质磷酸化修饰的状态。蛋白质磷酸化是细胞内最常见的蛋白质翻译后修饰,是真核细胞信号转导的核心,参与调节几乎所有的生命活动,包括细胞周期、发育与分化、新陈代谢以及细胞凋亡等。蛋白质磷酸化水平的变化会直接影响蛋白质的功能,例如超极化激活的阳离子通道 HCN1 是一类表达于神经元上的蛋白质,能够控制神经元的电传输,其功能变化能够直接影响神经元兴奋性。有学者指出,激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 能够降低神经元上 HCN1 的表达,并使其介导的 HCN 电流(I_h) 激活曲线向超极化方向移动,导致神经元兴奋性异常增加,而这与癫痫病理情况下 HCN1 的变化一致,同时,抑制 PKC 活性具有抗癫痫作用^[7]。

卡英酸诱导的癫痫模型小鼠能够很好地模拟人类颞叶癫痫的发病过程,造模成功 3 ~ 4 周时进入慢性发作期。利用磷酸化蛋白组学对卡英酸颞叶癫痫模型小鼠慢性发作期蛋白质进行研究,将为颞叶癫痫发病机制的研究和新靶点的发现提供新的思路。本研究旨在从蛋白质功能、信号通路和蛋白相互作用 3 个层面对小鼠颞叶癫痫慢性发作期海马体蛋白质的变化进行讨论,并结合文献提出一些可能的与癫痫发生相关的蛋白质。

1 材料与方法

1.1 实验药品与试剂

卡英酸粉末(ab120110)购自美国 Abcam 公司,戊巴比妥钠粉末(LGCFOR1368.00)购自博睿泰科生物科技(北京)有限公司,柠檬酸、三氟乙酸、甲醇、氨水、Tris、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、尿素、蛋白酶抑制剂(protease inhibitor,

PI)、磷酸酶抑制剂(phosphatase inhibitor, PPI)、核酸酶、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)均购自美国Sigma公司,胰酶购自美国Promega公司,Aqua反相填料购自美国Phenomenex公司,反相ReproSil-Pur C18-AQ填料购自德国Dr. Maisch GmbH公司,乙腈(acetonitrile, ACN)购自美国ThermoFisher Scientific公司,C18反相柱购自美国3M公司,HLB柱购自美国Waters公司,TiO₂填料购自日本GL Science公司。

1.2 实验器材与仪器

电子天平购自上海越平科学仪器有限公司;温控摇床购自北京北方同正生物科技发展有限公司;真空旋转抽干仪购自美国ThermoFisher Scientific公司;AKT Apurifier高效液相色谱仪购自美国GE公司;LTQ-Orbitrap Elite质谱仪购自美国ThermoFisher Scientific公司。

1.3 小鼠卡英酸模型的建立

小鼠适应性饲养2~3 d后,随机分组并称重,实验组腹腔注射卡英酸(30 mg/kg),对照组腹腔注射相同体积生理盐水。观察小鼠行为,按照Racine分级标准对小鼠行为进行1~5分的评分:1分:静卧不动;2分:不自主点头;3分:连续的身体抽搐;4分:身体不受控制地阵挛发作和/或跳跃起;5分:癫痫大发作。小鼠癫痫发作达到4分即为造模成功。造模成功1 h后,与对照组一同腹腔注射戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg),确认动物未死亡后单笼饲养。在造模成功第28天取实验组和对照组小鼠海马组织,进行磷酸化蛋白组学的研究。

1.4 磷酸化蛋白组学实验步骤

1.4.1 海马组织的分离 小鼠断头后,迅速开颅取出大脑,并将海马组织分离,低温冷冻数秒,取出后置于-80℃低温保存。

1.4.2 蛋白质的提取 两只小鼠的海马组织合并为一个样品,将样品在裂解液中裂解。裂解液组成为溶剂Tris(100 mmol/L, pH 7.5)、0.1% (质量分数)蛋白酶抑制剂、1% (质量分数)磷酸酶抑制剂、10 mmol/L MgCl₂、1% (质量分数)DNA酶和1% (质量分数)RNA酶,每个样品用量800 μL。裂解后进行超声处理,按体积比1:10比例加入10% (质量分数)SDS,振荡。

1.4.3 蛋白质浓度测定 用BCA试剂盒测样品蛋白质浓度,取等量蛋白质,9:1(蛋白质体积:DTT体积)分别加入1 mol/L DTT,金属浴加热5 min,在20℃下12 000 r/min离心10 min去除不溶的细胞

碎片杂质。

1.4.4 蛋白质提纯 取超滤管,加1 mL 8 mol/L尿素溶液(尿素+Tris pH 8.5),加入样品,在20℃下4 200 r/min离心30 min并重复1次。5 mL 8 mol/L尿素加50 mg IAA(避光)配制成溶液,取1 mL加入离心后的溶液中,避光反应30 min。在20℃下4 200 r/min离心30 min,加入1 mL 8 mol/L尿素溶液,在20℃下4 200 r/min离心30 min洗涤,重复1次。在20℃下4 200 r/min离心30 min,加入1 mL 4 mol/L尿素溶液,在20℃下4 200 r/min离心30 min洗涤,重复1次。在20℃下4 200 r/min离心30 min,加入1 mL 2 mol/L尿素溶液,在20℃下4 200 r/min离心30 min洗涤,重复1次。

1.4.5 蛋白质的酶解 将超滤管下面的离心管换成新的15 mL离心管后,在超滤管中加入含有胰酶的Tris溶液(900 μL 1 000 mmol/L Tris, pH 8.5 + 100 μL胰蛋白酶+10 μL CaCl₂+样品),温控摇床振荡过夜。在20℃下4 200 r/min离心30 min,加入1 mL超纯水,在20℃下4 200 r/min离心30 min。

1.4.6 脱盐 取HLB柱,先用甲醇润湿,然后加入洗涤液0.1% (质量分数)TFA平衡,平衡后加入样品,再加入0.1% TFA洗涤。最后用洗脱液[50% (质量分数)ACN,0.1% TFA]洗脱样品,收集所得溶液1.5 mL,用真空旋转抽干仪抽干。用0.1% TFA洗涤HLB柱,进行下一个样品的加样。-20℃冻存抽干后待用。

1.4.7 液相纯化 用超纯水配制0.1% TFA、90% ACN溶液,将试剂瓶放入超声波清洗器中、瓶盖微松,超声5 min以排出气泡。拆柱,检测是否有漏液现象。用90% A液(0.1% TFA,溶剂ACN)+10% B液(0.1% TFA)溶解酶解后得到的肽段,超声,12 000 r/min离心10 min。装柱,加样品,用AKTA高效液相色谱仪进行亲水相互作用分离,得到22个组分,分别抽干。将所得22个组分用0.1% TFA溶解,前10个组分每2个合并为1个样品,后12个组分全部合并,共得6个肽段样品。

1.4.8 磷酸化肽段富集 样品分别用上样液1[10 mL 1 mol/L CA,溶剂50% ACN、2% TFA]溶解,每个样品400 μL。取TiO₂填料,按10 mg TiO₂:1 mL甲醇的比例配成混悬液,取20 μL混悬液用真空旋转抽干仪抽干,将TiO₂填料用CA平衡,具体操作是在TiO₂填料中加入上样液1,振荡、离心,吸去上清液。向上述TiO₂填料加入一个样品,旋转混合仪孵育30 min,离心,收集上清液,用真空旋转抽干仪抽干,保

留用于下一次富集。向上述 TiO₂ 填料加入 40 μL 上样液 1、旋转混合仪孵育 5 min、离心、吸去上清液，再加入 40 μL 1 mol/L CA、旋转 5 min、离心、吸去上清液。TiO₂ 填料加入 40 μL 洗涤液 (50% ACN, 0.1% TFA)，振荡、离心、吸去上清液，重复。再加入 40 μL 洗涤液 (0.1% TFA)，振荡、离心、吸去上清液，重复。TiO₂ 填料加入 40 μL 洗脱液 [50% ACN, 8% (质量分数) 氨水]，振荡、离心、收集上清液，再加入 40 μL 洗脱液 (50% ACN, 8% 氨水)，振荡、离心、收集上清液。剩下的 TiO₂ 填料用 200 μL 甲醇洗涤，完成后用 100 μL 甲醇浸泡。第 1 次富集后收集的未结合的组分用 HLB 柱脱盐，方法同前，收集所得溶液，用真空旋转抽干仪抽干。用 50% ACN 和 2% TFA 将 CA 的浓度由 1 mol/L 稀释至 50 mmol/L 得上样液 2。以上样液 2 重复磷酸化肽段的富集。

1.4.9 LC-MS 分析 抽干后的肽段混合物用 10 μL 的 1% (质量分数) 的甲酸溶解，吸取 5 μL 在液相色谱仪上进行反相柱分离。首先样品结合在 100 μm × 20 mm 的预柱上，预柱是自己制作的灌有反相 Aqua 填料 (5 μm, 200 × 10⁻¹⁰ m)。然后样品在 100 μm × 10 cm 的分离柱上被分离，分离柱也是自己制作的装有反相 ReproSil-Pur C18-AQ 填料 (3 μm, 120 × 10⁻¹⁰ m)。分离梯度为 5% ~ 30% 含 0.1% (质量分数) 甲酸的乙腈，100 min 线性梯度。样品从纳升电喷雾离子源中喷出并离子化后，由 LTQ-Orbitrap XL 质谱仪采集数据。

1.4.10 数据分析 质谱中采集到的数据统一用 MaxQuant (版本 1.3.0.5) 进行分析。检索所用数据库为 IPI 蛋白数据库 (版本 3.87) 和 UniprotKB 的小鼠蛋白序列库 (版本 2012_07, 37 327 个蛋白序列)。

1.5 生物信息学检索

1.5.1 GO (Gene Ontology) 数据库检索 GO 数据库由基因本体联合会 (Gene Ontology Consortium) 建立，旨在建立一个适用于各种物种，对基因和蛋白质功能进行限定和描述，并能随着研究不断深入而更新的语言词汇标准。GO 提供了三层结构的系统定义方式，用于描述基因产物的功能，即分子功能、生化过程和细胞组件。GO 数据库能够对输入的蛋白质从这 3 个方面进行蛋白聚类，网址为 <http://www.geneontology.org/>。

1.5.2 KEGG 数据库检索 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库由日本京都大学生物信息学中心建立，能够把从已经完整测序的基因组中得到的基因目录与更高级别的细胞、物种和生态系统水平的系统功能关联起来，是一个生物系统的计算机模拟。本研究主要应用 KEGG PATHWAY 数据库，对蛋白质参与的信号转导通路进行预测，网址为 <https://www.kegg.jp/>。

1.5.3 STRING 数据库 STRING 数据库是一个搜寻已知蛋白质之间和预测蛋白质之间相互作用的系统，这种相互作用包括蛋白质间直接的物理相互作用和间接的功能相关性。该数据库通过特有的打分框架，能够以图形的形式展现蛋白质相互作用网络，网址为 <https://string-db.org/>。

2 结果

2.1 磷酸化蛋白组学定量分析

出于质谱检测精度的考虑，选取检出密度 (Density) 大于 10⁶ 的数据进行统计分析，质谱检测出 3 435 个蛋白质，共 12 697 个磷酸化位点发生了变化，其中 159 个位点磷酸化水平改变 50% 以上，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 磷酸化蛋白组学检测数据汇总
Table 1 Summary of phosphoproteomic data

Items	Phospho site	Phospho protein	Up-regulated phospho site	Up-regulated phospho protein	Down-regulated phospho site	Down-regulated phospho protein
Total	12 697	3 435	4 597	2 084	3 531	1 791
$P < 0.05$	159	147	118	112	41	40

$n = 4$.

2.2 蛋白功能注释统计

利用 GO 数据库能够对蛋白质功能进行生物信息学分析。对表达量显著变化的 159 个位点进行 GO 数据库检索的结果如图 1 所示。

39.5% 的蛋白质功能与结合相关，这类蛋白主

要参与分子与分子之间的特异性结合。35.7% 的蛋白质功能与催化活性相关，这类蛋白质能够催化细胞内的生化反应。20.8% 的蛋白质参与细胞交流，这类生化过程指细胞和它周围的环境产生的相互作用。

2.3 蛋白质参与信号通路统计

信号转导通路对细胞的生命活动有极其重要的调控作用,当外界环境发生变化时,各种信号转导分子相互作用,对信息进行转换和传递,细胞再通过这些信号转导通路对外界刺激做出反应。利用 KEGG 数据库能够对系列蛋白参与的信号转导通路进行统计和分析。对表达量显著变化的 159 个位点进行 KEGG 数据库检索和匹配,发现磷酸化水平显著变化的蛋白质参与的信号转导通路共 10 条(表 2)。

2.4 蛋白质相互作用统计

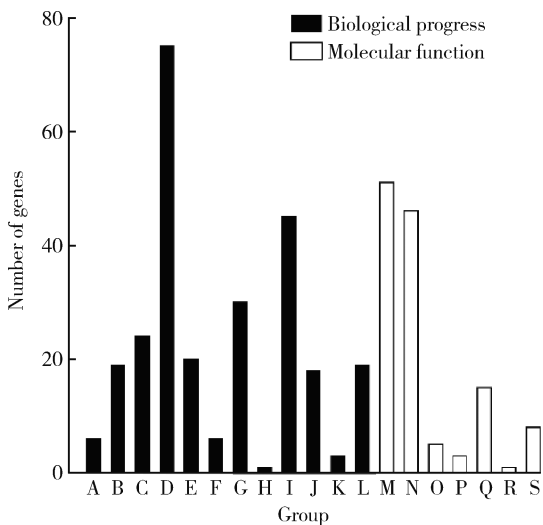
通过检索 STRING 数据库能够对蛋白-蛋白(基因-基因)相互作用做出分析。对磷酸化水平显著变化的 159 个位点进行 STRING 数据库检索,可以明显观察到以 Grin1 和 Dlg3 为核心,以 Arhgef 2、Arhgap33 和 Tiam1 为核心与以 Spnb1/3/4、Add3 和 Ank2 为核心的蛋白质相互作用网(图 2)。

对其中的关键蛋白质等进行定量统计,结果如图 3 所示,Grin1、Arhgef 2、Arhgap33、Tiam1、Sptbn1/2/4 和 Ank2 等基因(蛋白质)磷酸化水平在癫痫慢性发作期显著升高。

表 2 信号转导通路汇总

Table 2 Summary of signaling pathways involved in epileptogenesis

Signaling pathways	Number of genes	Percentage/%	P value	Benjamini
Glutamatergic synapse	7	4.7	<0.001	0.03
Ras signaling pathway	8	5.4	<0.001	0.11
African trypanosomiasis	4	2.7	<0.001	0.08
Cocaine addiction	4	2.7	<0.001	0.17
Circadian entrainment	5	3.4	<0.001	0.15
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	4	2.7	<0.001	0.13
Long-term potentiation	4	2.7	<0.001	0.21
Endocytosis	7	4.7	<0.001	0.26
Gap junction	4	2.7	<0.001	0.31
Nicotine addiction	3	2	<0.001	0.35



A, biological adhesion; B, biological regulation; C, cellular process; D, cellular component organization or biogenesis; E, developmental process; F, immune system process; G, localization; H, locomotion; I, metabolic process; J, reproduction; K, multicellular organismal process; L, response to stimulus; M, binding; N, catalytic activity; O, receptor activity; P, signal transducer activity; Q, structural molecule activity; R, translation regulator activity; S, transporter activity.

图 1 GO 数据库功能注释统计

Figure 1 Summary of functions of phosphorylated proteins by matching GO database

3 讨论

3.1 磷酸化蛋白功能注释分析

39.5% 的蛋白质功能与结合相关,文献检索的结果显示,其中的部分蛋白质和颞叶癫痫的发病机制密切相关,如 Ctnna2 编码的连环蛋白 $\alpha 2$ (catenin alpha-2) 能够连接钙黏着蛋白黏附受体和细胞骨架,对细胞黏附和分化具有调控作用^[8],同时对突触可塑性产生影响^[9],在发育过程中对小脑和海马体的分层进行调控^[10]。由 Wnt/ β -catenin 介导的信号通路能够对神经发生产生重要的影响,从而在海马体神经环路重塑中发挥重要作用,最终导致颞叶癫痫的反复发作。同时,纠正这条信号通路能够发挥神经保护的作用^[11]。Calb2 编码的钙结合蛋白 (calretinin) 表达于 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能中间神经元,这类神经元在海马体抑制性神经网络中发挥重要作用。在海马硬化的癫痫模型中,表达钙结合蛋白的中间神经元数量下降,导致对锥体细胞的抑制能力下降,最终导致癫痫的反复发作^[12]。其他一些基因(蛋白质)如 Mtap1b、Tiam1、

反应性星形胶质细胞增生,这类星形胶质细胞中的谷氨酰胺合成酶表达异常,使其对谷氨酸的代谢能力明显减弱,使胞外谷氨酸浓度异常升高,从而导致癫痫的反复发作^[16]。另外,谷氨酰胺合成酶功能缺失的患者也会表现出癫痫发作^[17]。谷氨酸等神经递质的代谢会对神经元功能产生重要影响,相关蛋白质的功能与颞叶癫痫的关系不失为一个很好的研究方向。

总之,突触的微小结构改变和神经元细胞骨架的改变是重要的病理变化,阐明相关蛋白的功能变化可能会揭示颞叶癫痫的发病机制。同时,神经元相互之间的信息传递异常和神经递质的代谢异常也会与颞叶癫痫的发病产生关联。

3.2 癫痫相关信号通路分析

文献检索的结果显示,磷酸化蛋白组学提示的相关 10 条信号通路可能与癫痫的发病机制密切相关,“Glutamatergic synapse”信号通路能够调节谷氨酸能突触,这类突触可以调控兴奋性神经递质谷氨酸的释放,在大鼠癫痫模型中,海马体谷氨酸释放过量,引起神经元兴奋性异常增加,最终导致癫痫的反复发作^[18-20]。Glut 是“Glutamatergic synapse”信号通路重要的组成成分,与谷氨酸的代谢直接相关,它的磷酸化水平会直接影响谷氨酸能突触的功能。同时可以观察到“Glutamatergic synapse”信号通路中 Gkap 编码的突触后蛋白 (postsynaptic scaffold) 和 NMDAR 磷酸化水平发生显著变化,这两种蛋白质与突触可塑性相关的改变在癫痫中发挥重要作用。由 Girk 编码的 Kir3.2 钾通道是另一种在“Glutamatergic synapse”信号通路中磷酸化水平发生显著性变化的蛋白质,它可以被 GABA_B受体激活,对神经元兴奋性进行调控^[21]。

Ras-GRF1 (Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1) 是 Ras 信号通路重要的组成部分,能够调节突触可塑性并可能参与神经元兴奋性的调节。Ras-GRF1 缺失的小鼠神经元兴奋性更高,且小鼠癫痫易感性更高^[22]。同时 Ras-GRF1 还可以和 NMDA 受体 NR2B 亚基相结合,通过 Ras-ERK 信号通路对神经元可塑性进行调节。在颞叶癫痫患者和大鼠匹罗卡品癫痫模型中均能检测到 Ras-GRF1 的表达含量降低^[23]。磷酸化蛋白组学结果显示,在 Ras 信号通路中,NF1 和 Ras GAP 磷酸化水平显著变化,它们与 Ras-GRF 都是 Ras 信号通路重要的调控蛋白,但调控作用相反。Tiam1 是 Ras 信号通路中磷酸化水平显著性改变的基因(蛋白质)之一,它编码的 T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1

蛋白能够调控 Rho 样蛋白,激活 RAC1、CDC42 和 RHOA 等 Rho GTPase 家族蛋白,对细胞黏附和细胞迁移进行调控。另外,Tiam1 还能够连接胞外信号和细胞骨架活动。

“Long-term potentiation” (LTP) 信号通路对 AMPA受体、NMDA受体、mGlu受体等谷氨酸受体进行调控,NMDA受体依赖的癫痫发生往往伴随着 LTP 的发生^[24]。腹腔注射匹罗卡品能够诱导 schaffer collateral-CA1 间突触的 LTP 产生,从而导致癫痫^[25]。在 LTP 信号通路中 NMDAR 和 PLC (phospholipase C) 的磷酸化水平发生显著性变化。在小鼠匹罗卡品癫痫模型中,小鼠海马体中间神经元 PLC 含量降低,PLC 的功能可能与癫痫持续状态的维持相关^[26]。同时有学者发现,PLC $\beta 1$ 的缺失与早发性癫痫的产生有关^[27]。

以上信号通路和相关蛋白的检出说明磷酸化蛋白组学应用于颞叶癫痫研究具有一定的可靠性。

3.3 蛋白质相互作用网络分析

对蛋白-蛋白相互作用网络的核心蛋白进行进一步的文献检索的结果显示,Grin1 编码 NMDAR1 (N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1) 蛋白,是一类离子型谷氨酸受体,与兴奋性谷氨酸能突触可塑性密切相关。日本横滨市立大学研究员利用第二代测序的方法,在智力障碍和早发性癫痫脑病患者中检测到 Grin1 基因的突变,突变位于 pre-M1 helix (D552E)、M3 转膜结构域 (M641I 和 N650K) 和 M4 转膜结构域 (G815R),证明 Grin1 可能是早发性癫痫的相关基因之一^[28]。有学者发现,内分子层颗粒细胞树突中 NMDAR2A/B 表达含量在卡英酸造成脑损伤后显著升高,且早于苔藓纤维出芽 (MFs)^[29]。苔藓纤维出芽是颞叶癫痫重要的病理变化之一。正常生理状态下,海马体齿状回 (dentate gyrus, DG) 颗粒细胞轴突只向门区和 CA3 区神经元进行投射,但在卡英酸造成脑损伤后或在癫痫病理状态下,颗粒细胞轴突向内分子层和上颗粒层进行投射,形成大量新突触连接,且主要是兴奋性投射,使海马神经环路中兴奋性信号被放大,最终导致癫痫的反复发作^[30]。NMDA2A/B 在癫痫中表达含量升高,且这种变化早于苔藓纤维出芽,这就意味着 NMDAR2A/B 的含量变化可能可以作为颞叶癫痫疾病发展进程的一个观测指标。由蛋白质相互作用网可以看到(图 2),Grin1 和 Grin2A 相互作用显著。组学数据显示,Grin1 和 Grin2A 的磷酸化水平在癫痫中显著性升高(图 3),即其编码的 NMDAR1 和 NMDAR2A 磷酸化水平在癫痫中显著性升高。磷酸

化蛋白组学的数据确认了NMDAR2A蛋白功能在癫痫中增强,同时验证了磷酸化蛋白组学检测癫痫病理变化的可靠性。

Arhgef 2 编码的 Rho guanine nucleotide exchange factor 2 蛋白能够激活 Rho GTPase, Rho GTPase 家族包括 Rho (A/B/C)、Rac (1/2/3)、Cdc42、Rnd、RhoD、RhoBTB 和 RhoH, 在细胞迁移中发挥重要作用。Grlf1 编码的 Rho GTPase activating protein 35 能够调控 Rho GTPase 蛋白的 GTP 和 GDP 的相互转化,并参与 SRC 依赖的来自于细胞表面黏附分子的信号转导,促进神经突起生长,调节轴突生长、引导和自发收缩,对细胞迁移产生影响^[31]。Arhgef2、Arhgap33 和 Tiam1 基因(蛋白质)都涉及到 Rho GTPase 的调控。Rho GTPase 家族蛋白的 3 个成员 Cdc42、Rac 和 RhoA 被广泛研究,它们在细胞极化、囊泡装配、细胞周期和细胞转录中发挥重要作用。在中枢神经系统中,树突上树突棘的形成与这些蛋白质密切相关。当钙离子通过 NMDA 受体进入胞内后,钙离子与钙调蛋白相结合,激活 CaMK II,增加 Rac1/Cdc42 活性并降低 RhoA 活性,促进树突生长和分支^[32]。在苔藓纤维出芽过程中,伴随着大量新突触的形成,这就可能导致 Rho GTPase 相关蛋白的功能增强。而磷酸化蛋白组学的数据也验证了这一点。另外,新突触的形成必然伴随着细胞骨架的改变,磷酸化蛋白组学的数据(图 3)能够观察到以 Spnb1/3/4 和 Ank2 基因(蛋白质)为核心的细胞骨架相关蛋白磷酸化水平显著升高。

Spnb1/3/4 编码的蛋白质是血影蛋白的组成成分,Ank2 则编码锚定蛋白。Add3 编码的内收蛋白(adducin-like protein 70)是一种膜-细胞骨架相关蛋白,与肌动蛋白和血影蛋白复合体相结合,通过钙调蛋白影响细胞骨架蛋白的稳定性,这几种蛋白质均与细胞骨架密切相关。磷酸化蛋白组学数据显示,这些基因(蛋白质)磷酸化水平显著性升高(图 3),表明在癫痫慢性发作期细胞骨架活性增强。

以上的结果共同说明了磷酸化蛋白组学检测颞叶癫痫病理变化的可靠性。

3.4 可能的抗癫痫研究方向

KEGG 信号通路统计结果显示,“Cocaine addiction”信号通路在癫痫中磷酸化水平显著变化,这暗示学者们这条信号通路可能参与癫痫的分子生物学变化,它的核心是多巴胺和多巴胺能突触,长时程的可卡因摄入会对多巴胺受体功能产生影响。“Cocaine addiction”信号通路磷酸化水平的变化是否意味着多巴胺受体功能的变化,多巴胺突触是否

参与癫痫的发生和发展,有文献报道^[33],颞叶癫痫患者新皮层多巴胺功能异常,但是多巴胺在海马体中的功能以及与颞叶癫痫的发病机制相关性尚不明确,这就为癫痫的研究提供一些参考,即多巴胺体系功能异常是否与癫痫存在联系。

“Circadian entrainment”信号通路的改变涉及到 NMDA 受体的变化以及由 Kcnj3 编码的 G 蛋白激活的内向整流钾电流 Kir3.1 的磷酸化水平的变化。Kir3.1 可以被多种 G 蛋白偶联受体激活,包括多巴胺 D2 受体、GABA_B受体等,突触后膜的 GABA_B受体可以激活 Kir3.1,从而降低神经元兴奋性^[34]。Kir3.1 能够对神经元兴奋性进行调控,那么它就可能参与到颞叶癫痫的发生发展中。Kir3.1 钾通道与颞叶癫痫是否存在联系,这也可能成为癫痫研究的方向之一。

“Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)”信号通路的改变涉及由 Nefh 编码的神经纤维细丝(neurofilament heavy polypeptide)蛋白磷酸化的改变,而这个蛋白质则与轴突功能密切相关。Endocytosis 信号通路的改变涉及由 Asap1 编码的 ARF GTPase-activating protein 1 蛋白磷酸化的改变,这个蛋白质则与细胞生长和细胞骨架重塑相关。这些信号通路中涉及的蛋白质均有可能成为颞叶癫痫的研究对象。

综上所述,在癫痫的疾病发展过程中,大量蛋白质参与其中,磷酸化蛋白组学能够从宏观角度解释疾病发展过程,将疾病与蛋白质功能相关联,这就为疾病相关蛋白的筛选提供了一种选择。通过磷酸化蛋白组学对颞叶癫痫模型小鼠进行检测,观察到一系列癫痫相关的信号通路和蛋白质的磷酸化水平显著性变化,经过深入的探讨,验证了磷酸化蛋白组学对颞叶癫痫发病机制研究的可靠性,同时提出多巴胺功能和 Kir3.1 钾通道功能可能成为颞叶癫痫治疗的研究方向。

参考文献

- [1] 郭铭花,张敬军. 癫痫流行病学调查研究[J]. 中华脑科疾病与康复杂志: 电子版, 2013, 3(5): 46-48.
- [2] Hesdorffer DC, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. Potential role of antiepileptic drugs [J]. CNS Drugs, 2013, 27(2): 113-119.
- [3] 佟晓燕,王玉平. 成年癫痫患者抑郁、焦虑状况及生活质量调查[J]. 脑与神经疾病杂志, 2009, 17(2): 123-126.
- [4] Brodie MJ, Kwan P. Newer drugs for focal epilepsy in adults [J]. BMJ, 2012, 344: e345.
- [5] Schmidt D, Sillanpää M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies [J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(2): 159.
- [6] Palleria C, Coppola A, Citraro R, et al. Perspectives on treatment options for mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclero-

- sis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(15): 2355.
- [7] Williams AD, Jung S, Poolos NP. Protein kinase C bidirectionally modulates Ih and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons [J]. *J Physiol*, 2015, 593(13): 2779 – 2792.
- [8] Takeichi M. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by α -catenin [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(4): 357 – 363.
- [9] Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, et al. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis [J]. *Neuron*, 2002, 35(1): 77 – 89.
- [10] Park C, Falls W, Finger JH, et al. Deletion in *Catna2*, encoding α -N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(3): 279 – 284.
- [11] Huang C, Fu XH, Zhou D, et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in disrupted hippocampal neurogenesis of temporal lobe epilepsy: a potential therapeutic target [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(7): 1319.
- [12] Tóth K, Maglóczky Z. The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy [J]. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 100.
- [13] Hardies K, Cai Y, Jardel C, et al. Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline [J]. *Brain*, 2016, 139(9): 2420 – 2430.
- [14] Milosevic I, Giovedi S, Lou X, et al. Recruitment of endophilin to clathrin coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission [J]. *Neuron*, 2011, 72(4): 587 – 601.
- [15] Di PG, Sankaranarayanan S, Wenk MR, et al. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice [J]. *Neuron*, 2002, 33(5): 789 – 804.
- [16] Eid T, Tu N, Lee TS, et al. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(7): 670 – 681.
- [17] Cerfontain H, Telder MA, Vollbracht L. Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency [J]. *J Inher Metab Dis*, 2006, 29(2/3): 352.
- [18] Upreti C, Otero R, Partida C, et al. Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 3): 869 – 885.
- [19] Putkonen N, Kukkonen JP, Mudo G, et al. Involvement of cyclin-dependent kinase-5 in the kainic acid-mediated degeneration of glutamatergic synapses in the rat hippocampus [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 34(8): 1212 – 1221.
- [20] Dingledine R. Glutamatergic mechanisms related to epilepsy: ionotropic receptors [J]. 2010, 51(s5): 15.
- [21] Kulik A. Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K⁺ channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4289.
- [22] Tonini R, Franceschetti S, Parolaro D, et al. Involvement of CDC25Mm/Ras-GRF1-dependent signaling in the control of neuronal excitability [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 18(6): 691 – 701.
- [23] Zhu Q, Wang L, Xiao Z, et al. Decreased expression of Ras-GRF1 in the brain tissue of the intractable epilepsy patients and experimental rats [J]. *Brain Res*, 2013, 1493(1): 99 – 109.
- [24] Moschovos C, Kostopoulos G, Papatheodoropoulos C. Long-term potentiation of high-frequency oscillation and synaptic transmission characterize *in vitro* NMDA receptor-dependent epileptogenesis in the hippocampus [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(2): 368.
- [25] Lenz M, Ben SM, Deller T, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus is associated with changes in the actin-modulating protein synaptopodin and alterations in long-term potentiation in the mouse hippocampus [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 2652560.
- [26] Liu JX, Hu M, Chen XL, et al. Reduced expression of phospholipase C beta in hippocampal interneuron during pilocarpine induced status epilepticus in mice [J]. *Neurochem Int*, 2014, 68(1): 10.
- [27] Kurian MA, Meyer E, Vassallo G, et al. Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy [J]. *Brain*, 2010, 133(10): 2964 – 2970.
- [28] Chen W, Yuan H. GRIN1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy [J]. *Pediatr Neurol Briefs*, 2015, 29(6): 44.
- [29] Mikuni N, Babb TL, Chakravarty DN, et al. NMDAR2 upregulation precedes mossy fiber sprouting in kainate rat hippocampal epilepsy [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 255(1): 25.
- [30] Buckmaster PS. Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 813: 161 – 168.
- [31] Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(4): 361 – 367.
- [32] Stankiewicz TR, Linseman DA. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 314.
- [33] Rocha L, Alonso-Vanegas M, Villeda-Hernandez J, et al. Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 499 – 507.
- [34] Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, et al. Human γ -aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14991 – 14996.

(2017-04-27 收稿)

(本文编辑:王 蕾)