



## GIRK通道在匹罗卡品癫痫模型中的表达改变

谢婉静, 杨玉凌, 黄逸安, 张昱雯, 丁晶, 汪昕

引用本文:

谢婉静, 杨玉凌, 黄逸安, 等. GIRK通道在匹罗卡品癫痫模型中的表达改变[J]. 中国临床医学, 2021, 28(6): 980–987.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20211980>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 七氟醚联合N<sub>2</sub>O吸入麻醉对老年大鼠学习与记忆的影响

Effect of sevoflurane combined with nitrous oxide on learning and memory in aged rats

中国临床医学. 2020, 27(5): 769–772 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200921>

### 七氟醚对C57小鼠海马基因表达的影响

Effect of sevoflurane on hippocampal gene expression in C57BL/6 mice

中国临床医学. 2020, 27(4): 628–634 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200904>

### 海藻糖对冻存海马神经元电生理特性的影响

Effect of trehalose on electrophysiological characteristics of cryopreserved hippocampal neurons

中国临床医学. 2020, 27(5): 773–778 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201637>

### 抗衰老酶1-p53信号通路在吸入麻醉致原代海马神经元细胞凋亡中的神经保护作用

SIRT1-p53 pathway protects against sevoflurane-nitrous oxide anesthesia-induced apoptosis in primary-cultured hippocampal neurons

中国临床医学. 2019, 26(6): 848–854 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190774>

### 半夏泻心汤对大鼠乙酸型胃溃疡的保护作用

Protective effect of *Banxiaxiexin* decoction on the experimental rats with gastric ulcer caused by acetic acid

中国临床医学. 2020, 27(6): 978–982 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20202119>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20211980

## GIRK 通道在匹罗卡品癫痫模型中的表达改变

谢婉静<sup>1</sup>, 杨玉凌<sup>1</sup>, 黄逸安<sup>2</sup>, 张昱雯<sup>1\*</sup>, 丁晶<sup>1\*</sup>, 汪昕<sup>1</sup>

1. 复旦大学附属中山医院神经内科, 上海 200032

2. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031

**引用本文** 谢婉静, 杨玉凌, 黄逸安, 等. GIRK 通道在匹罗卡品癫痫模型中的表达改变[J]. 中国临床医学, 2021, 28(6): 980-987. XIE W J, YANG Y L, HUANG Y A, et al. Alternation of GIRK channel expression in pilocarpine epilepsy model[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(6): 980-987.

**[摘要]** **目的:** 研究匹罗卡品诱导癫痫发作后不同时期 G 蛋白门控内向整流钾离子(GIRK)通道在大鼠海马神经元细胞膜表面表达变化情况, 并探索可能的调控机制。 **方法:** 将成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组和匹罗卡品造模组。利用致痫剂匹罗卡品诱导癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后, 分别在急性期(24 h)和慢性期(30 d)取海马组织提取膜蛋白, 利用 Western 印迹方法检测海马膜蛋白 GIRK 通道亚基蛋白 GIRK1、GIRK2 的表达改变, 并同时检测海马组织 PI3K/Akt 通路激活情况。建立细胞癫痫模型, 观察 PI3K 抑制剂渥曼青霉素和 LY294002 对海马神经元内向整流钾通道(Kir)电流的影响。 **结果:** 匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后, 急性期细胞膜上 GIRK1 和 GIRK2 蛋白的表达较对照组相比显著下调( $P < 0.05$ )。海马膜蛋白中 GIRK1 的表达在大鼠 SE 发作后慢性期较对照组下降( $P < 0.05$ ), 而 GIRK2 蛋白表达量没有显著改变。p-Akt(308)与 Akt 蛋白表达量的比值在匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后急性期与对照组相比显著上升( $P < 0.05$ ), 而在 SE 发作后慢性期差异无统计学意义。在细胞癫痫模型中, 渥曼青霉素和 LY294002 对痫样放电神经元的 Kir 电流未发现显著影响。 **结论:** 在匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后急性期, 海马中 GIRK 通道蛋白表达量下调, PI3K/Akt 通路存在明显激活。

**[关键词]** 癫痫; 海马; GIRK 通道; PI3K/Akt 通路**[中图分类号]** R 742.1 **[文献标志码]** A

### Alternation of GIRK channel expression in pilocarpine epilepsy model

XIE Wan-jing<sup>1</sup>, YANG Yu-ling<sup>1</sup>, HUANG Yi-an<sup>2</sup>, ZHANG Yu-wen<sup>1\*</sup>, DING Jing<sup>1\*</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>

1. Department of Neurology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the alternation in the expression of G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels on the cell membrane of hippocampal neurons at different periods after pilocarpine induced seizures, and to explore its possible regulatory mechanisms. **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into a control group and a pilocarpine model group. Pilocarpine was used to induce status epilepticus (SE). The hippocampal tissue were taken to extract membrane proteins in the acute phase (24 h) and the chronic phase (30 d) after SE. The expression changes of hippocampal membrane protein GIRK channel subunit proteins GIRK1 and GIRK2 were detected by Western Blot, and the expression of p-Akt and Akt proteins in the whole hippocampus was also detected at the same time. The cell epilepsy model was used to observe the changes of Kir currents in hippocampal neurons after the addition of PI3K inhibitor wortmannin and LY294002. **Results:** The expression of GIRK1 and GIRK2 protein on the rat neuronal membrane was significantly down-regulated compared with the control group in the acute phase after the SE induced by pilocarpine ( $P < 0.05$ ). The expression of GIRK1 in the hippocampal membrane protein of rats decreased in the chronic phase after the onset of SE ( $P < 0.05$ ), while the expression of GIRK2 protein did not change significantly. The ratio of p-Akt (308) and Akt protein expression levels increased significantly in the acute phase after the seizure induced by pilocarpine in rats compared with the control group ( $P < 0.05$ ), but did not change in the chronic phase after the seizure of SE. In the cellular epilepsy model, wortmannin and LY294002 had no significant effect on the Kir current of epileptiform neurons. **Conclusions:** In the acute phase after seizures of SE induced by

**[收稿日期]** 2021-08-27 **[接受日期]** 2021-11-29**[基金项目]** 国家自然科学基金(81801289). Supported by National Natural Science Foundation of China (81801289).**[作者简介]** 谢婉静, 硕士. E-mail: 18211210026@fudan.edu.cn

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-64041990, E-mail: ding.jing@zs-hospital.sh.cn; zhang.yuwen@zs-hospital.sh.cn

pilocarpine in rats and mice, the expression of GIRK channel protein in the hippocampus is down-regulated to varying degrees, and the PI3K/Akt pathway is significantly activated during the same period.

**[Key Words]** epilepsy; hippocampus; GIRK; PI3K/Akt

癫痫是常见的中枢神经系统疾病之一,临床表现为有持久的癫痫发作倾向,有发作性、短暂性、刻板重复的特点,其主要病理生理特征是神经元异常同步化放电<sup>[1]</sup>。神经元兴奋性的维持依赖于各种离子通道的活动。内向整流型钾离子(Kir)通道是钾离子通道家族的一类,具有介导钾离子内流效率高于钾离子外流效率的内向整流特性。目前已发现多种 Kir 通道与癫痫发生有关。Kir4.1 电流及 Kir4.1 蛋白表达在颞叶癫痫患者和癫痫动物模型中均有明显改变<sup>[2-4]</sup>;特异性敲除 Kir6.2 通道更容易在高热惊厥动物模型中诱发癫痫发作<sup>[5]</sup>;Kir2 通道在颞叶癫痫动物模型中表达升高<sup>[6]</sup>。

G 蛋白耦联的 Kir(GIRK)通道是 Kir 通道的一类,在哺乳动物中主要存在 GIRK1~4 四种亚基<sup>[7]</sup>。在中枢神经系统中 GIRK1~3 亚基广泛表达在大脑皮层、海马等部位,主要分布在神经元树突棘和胞体上<sup>[8]</sup>。GIRK 通道开放能使神经元膜电位向超级化方向偏移,进而稳定神经元膜电位、调节神经元放电频率<sup>[9]</sup>。GIRK 通道的功能异常与癫痫易感性相关,在戊四氮的诱导下,GIRK2 亚基敲除的小鼠癫痫发作的潜伏期比野生型小鼠显著缩短,发作程度更加严重<sup>[10]</sup>。GIRK 通道抑制剂 Tertiapin Q (TPQ)能增加离体神经元在无镁溶液中的痫样放电频率<sup>[11]</sup>,而 GIRK 通道激动剂能够延长戊四氮诱导的小鼠癫痫发作的潜伏期<sup>[12-13]</sup>。目前,癫痫发作后 GIRK 通道表达改变尚缺少深入研究,其具体调控机制尚需阐明。本研究首先建立匹罗卡品诱导大鼠癫痫模型,检测癫痫持续状态(status epilepticus, SE)发作后急性期和慢性期海马组织膜蛋白中 GIRK 通道表达的变化,并进一步在细胞癫痫模型中探讨磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)通路在其中的可能机制,研究 GIRK 通道与癫痫发作之间的关系,为癫痫的治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 选择 8~12 周体质量为 180~220 g 的雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(斯莱克实验动物公司)用于匹罗卡品癫痫动物模型的构建。氯化

锂、阿托品、匹罗卡品购自 Sigma 公司,地西洋购自上海旭东海普药业有限公司,SDS-PAGE 试剂盒购自碧云天公司,GIRK1、GIRK2 抗体购自 GeneTex 公司,p-Akt(T308)、Akt 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 匹罗卡品诱导癫痫模型 先在大鼠腹腔注射氯化锂溶液(127 mg/kg)以提高匹罗卡品的易感性。18~24 h 之后,腹腔注射 1 mg/kg 阿托品阻断外周胆碱能反应,30 min 后 PILO 组大鼠经腹腔注射 30 mg/kg 匹罗卡品,对照组大鼠经腹腔注射等剂量生理盐水。

根据 Racine 分级,对大鼠癫痫发作行为进行观察和评级。将发作级别达到Ⅲ级以上,且持续发作时间超过 30 min 的发作认为是癫痫持续状态(SE),达到 SE 发作且未死亡的大鼠认为造模成功,达到 SE 发作标准的动物给予 1 mg/kg 地西洋终止发作。

Racine 分级标准<sup>[14]</sup>为 I 级:流口水,咀嚼运动,面部肌肉抽搐;Ⅱ级:点头运动,颈部肌肉抽搐;Ⅲ级:单侧前肢阵挛;Ⅳ级:双侧前肢阵挛,四肢强直性痉挛,且出现后肢站立;Ⅴ级:在Ⅳ级基础上失去平衡,跌倒或伴翻滚、跳跃、尖叫。

1.3 蛋白提取 提取全蛋白时使用 RIPA 裂解液裂解组织,并加入蛋白酶抑制剂(Roche 公司)和磷酸酶抑制剂(Roche 公司),充分匀浆组织后,4℃下 10 000×g 离心 15 min,弃去底部组织块沉淀,收集上清液。

提取膜蛋白时使用试剂盒(Biovision 公司)中提供的裂解液和酶抑制剂,根据试剂盒说明书进行反复梯度离心和萃取,最终得到细胞膜蛋白沉淀,用 0.5%TBST 重悬。全蛋白和膜蛋白浓度均使用 BCA 试剂盒测量,将蛋白和 5×loading buffer 按照 4:1 的比例混匀,全蛋白用 95℃ 5 min 进行蛋白变性,胞膜蛋白用 45℃ 45 min 进行蛋白变性。

1.4 Western 印迹步骤 电泳:配置 10%分离胶和浓缩胶,按照 10 μg 蛋白量上样,在 60 V 电压下恒压电泳 30 min,再将电压改为 120 V 继续电泳 60 min。转膜:在甲醇中浸泡 3 min 使 PVDF 膜活化,在转膜液中按照黑色转膜夹-海绵-滤纸-凝胶-

PVDF膜-滤纸-海绵-白色转膜夹(即“黑胶白膜”)的顺序组装,倒入1 L转膜液并放置冰盒,在冰浴条件下以280 mA的电流恒流转膜80 min。封闭:将置于0.05%TBST配置的5%脱脂奶粉中,室温条件下在慢速摇床上孵育2 h。一抗孵育:4℃孵育过夜。本文所用抗体浓度:p-Akt(T308)1:1 000, Akt 1:1 000, GIRK1 1:1 000, GIRK2 1:1 000, GAPDH 1:2 000。二抗孵育:用5%脱脂牛奶按照1:10 000的比例配制相应二抗,在室温条件下孵育1.5 h。显影:配置ECL发光液,均匀滴在膜上,避光条件下反应2 min后,将膜放入显影仪中选择合适曝光时间进行曝光成像。

**1.5 细胞电生理实验** 利用孕17~19 d SD大鼠的胎鼠进行原代海马神经元的培养,选取体外培养至第14 d的神经元进行电生理记录。采用环噻嗪孵育48 h的方法建立细胞癫痫模型,同时用PI3K抑制剂蒺曼青霉素与环噻嗪共孵育以观察PI3K抑制剂对痫样放电神经元GIRK通道功能是否有影响。在电压钳模式下记录神经元Kir电流,将神经元膜电位以-10 mV的梯度从-60 mV降低至-160 mV,时长为200 ms,记录间隔在5 s以上。

**1.6 统计学处理** Western印迹成像结果使用Image J软件进行处理,使用GraphPad软件进行统计分析和作图细胞电生理数据使用Clampfit软件进行统计分析和作图。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现, $n$ 值表示样本数量。先对数据进行正态性检验,若符合正态分布,则使用Student- $t$  test进行两组数据组间数据比较的统计分析,若不符合正态分布,则使用非参数检验(Mann-Whitney  $U$  test)进行统计分析,使用Two-way ANOVA方法比较Kir通道电流-电压(I-V)曲线的差异。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

### 2.1 海马GIRK通道SE发作后不同时期的表达

共使用45只成年雄性SD大鼠进行匹罗卡品造模,以SE发作达到4级以上、持续发作时间达到30 min以上作为造模成功的判定标准,未达到SE发作标准的大鼠有2只,造模失败率为4.44%;达到SE发作标准的大鼠有43只。其中SE发作过程中及发作后24 h内死亡大鼠有18只;而在SE后7 d至30 d死亡的大鼠有2只。

本研究首先对GIRK通道在匹罗卡品诱导大鼠SE发作后急性期(24 h)海马组织细胞膜上的表

达情况进行检测。随机选取匹罗卡品造模成功且24 h内未死亡的10只大鼠作为造模组(PILO 24 h组),并选择生理盐水代替匹罗卡品注射的8只大鼠作为同期对照组(CON 24 h组)。PILO 24 h组大鼠海马GIRK1亚基蛋白表达水平相对灰度值为 $0.771 \pm 0.234$ ,与对照组( $0.999 \pm 0.131$ )相比,显著降低( $P=0.026$ ,图1A、1C)。PILO组大鼠海马GIRK2亚基蛋白表达水平相对灰度值为 $0.814 \pm 0.128$ ,与对照组( $1.039 \pm 0.157$ )相比,同样有明显的降低趋势( $P=0.004$ ,图1B、1D)。海马内GIRK1亚基和GIRK2亚基的表达水平在匹罗卡品诱导大鼠SE发作后24 h较对照组有所下调。

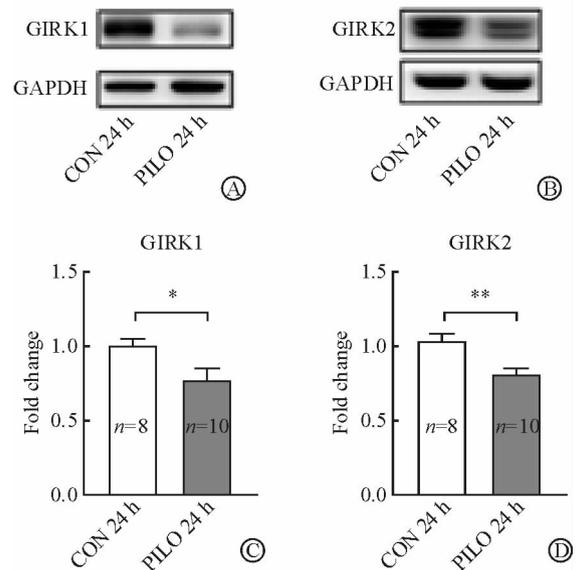


图1 海马GIRK通道在匹罗卡品诱导SE发作后急性期的表达情况

A~B:对照组大鼠(CON 24 h)、匹罗卡品造模24 h后大鼠(PILO 24 h)海马组织膜蛋白GIRK1、GIRK2亚基显影图像;C~D:2组GIRK1、GIRK2蛋白表达统计结果。\*: $P<0.01$ , \*: $P<0.05$ 。

本研究进一步对GIRK通道在匹罗卡品诱导大鼠SE发作后慢性期(30 d)海马组织细胞膜上的表达情况进行检测。随机选取匹罗卡品造模成功且至30 d未死亡的4只大鼠的海马组织作为造模组(PILO 30 d组),并选择生理盐水代替匹罗卡品注射的4只大鼠的海马组织作为同期对照组(CON 30 d组)。PILO 30 d组大鼠海马GIRK1亚基蛋白表达水平( $0.841 \pm 0.041$ )与CON组( $1.014 \pm 0.044$ )相比显著降低( $P=0.029$ ,图2A、2C)。PILO组大鼠海马GIRK2亚基蛋白表达水平( $0.821 \pm 0.064$ )与CON组( $1.031 \pm 0.101$ )相比,差异无统计学意义(图2B、2D)。因此,在匹罗卡品

诱导大鼠 SE 发作后慢性期,海马内 GIRK1 亚基表达水平均较对照组显著下调。

因此,海马 GIRK 通道亚基表达水平在大鼠 SE 发作后急性期和慢性期均有显著降低。

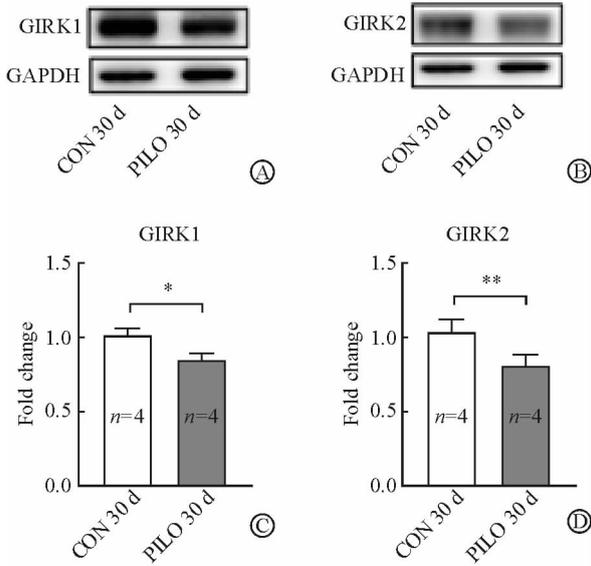


图2 海马 GIRK 通道在匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后慢性期的表达情况

A、B:对照组大鼠(CON 30 d)、匹罗卡品造模 30 d 后大鼠(PILO 30 d)海马组织膜蛋白 GIRK1、GIRK2 亚基的显影图像;C、D:2 组 GIRK1、GIRK2 的蛋白表达统计结果。\*: $P < 0.05$ , ns: $P > 0.05$ 。

2.2 PI3K/Akt 通路在 SE 发作后不同时期的激活情况 在下丘脑 POMC 神经元表面,GIRK 通道的功能受胞内 PI3K/Akt 通路的影响,推测 SE 发作后 GIRK 通道表达与功能的变化可能与 PI3K/Akt 通路相关。因此,本研究进一步检测了大鼠 SE 发作后急性期和慢性期海马 PI3K/Akt 通路的激活情况。随机选取匹罗卡品造模成功且 24 h 内未死亡的 6 只大鼠的海马组织作为造模组(PILO 24 h 组),并选择生理盐水代替匹罗卡品注射的 6 只大鼠的海马组织作为同期对照组(CON 组),用 p-Akt (T308)与 Akt 蛋白表达水平的比值表示 Akt 的磷酸化程度,同时也表示 PI3K/Akt 通路的活化程度。经数据归一化处理,PILO 24 h 组大鼠海马组织中 p-Akt(T308)与 Akt 蛋白表达水平比值的相对灰度值为  $1.288 \pm 0.226$ ,与 CON 组的相对灰度值  $0.956 \pm 0.190$  相比,有显著差异( $P = 0.020$ ,图 3A、3C)。该结果表明在匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后的急性期,海马 GIRK 通道的表达下降的同时伴随着 PI3K/Akt 通路的激活。

本研究进一步对匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后

慢性期海马 PI3K/Akt 通路的激活情况进行检测。随机选取匹罗卡品造模成功且至 30 d 未死亡的 4 只大鼠的海马组织作为造模组(PILO 30 d 组),并选择生理盐水代替匹罗卡品注射的 4 只大鼠的海马组织作为同期对照组(CON 组)。PILO 30 d 组大鼠( $n = 4$ )海马组织中 p-Akt(T308)与 Akt 蛋白表达水平比值的相对灰度值为  $1.167 \pm 0.225$ ,与 CON 组( $n = 4$ )的相对灰度值  $1.228 \pm 0.165$  相比,差异无统计学意义(图 3B、3D)。因此,在 SE 发作后慢性期,GIRK 通道表达的改变可能与 PI3K/Akt 通路激活无关。GIRK 通道在 SE 发作后急性期的表达下调伴随着 PI3K/Akt 通路的激活,PI3K/Akt 通路可能是 SE 发作后 GIRK 通道变化的调控因素。

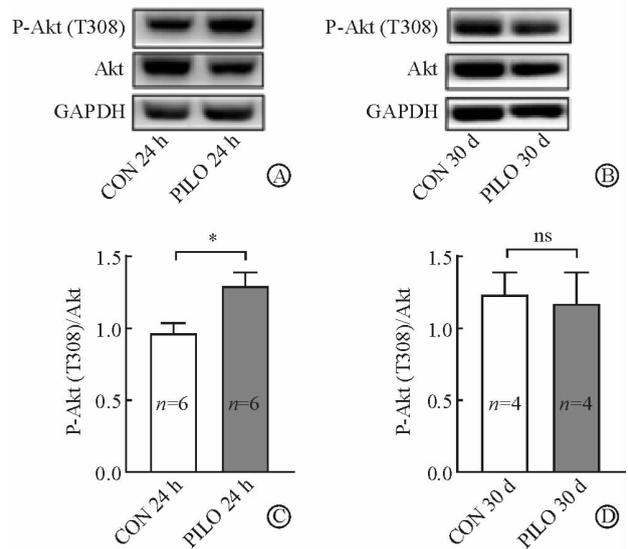


图3 PI3K/Akt 通路在匹罗卡品诱导 SE 发作后不同时期激活情况

A:对照组大鼠(CON)、匹罗卡品造模 24 h 后大鼠(PILO 24 h)海马组织全蛋白 p-Akt、Akt 的显影图像。B:对照组大鼠(CON)、匹罗卡品造模 30 d 后大鼠(PILO 30 d)海马组织全蛋白 p-Akt、Akt 的显影图像。C、D:各组 p-Akt/Akt 的蛋白表达统计结果。\*: $P < 0.05$ , ns: $P > 0.05$ 。

2.3 PI3K 抑制剂对痫样放电神经元 Kir 电流无明显作用 使用  $5 \mu\text{mol/L}$  环噻嗪(cyclothiazide, CTZ)孵育海马神经元 48 h 能够使神经元产生癫痫样放电,是一种研究痫样放电神经元电生理活动的有效细胞癫痫模型。因此,本研究利用 CTZ 细胞癫痫模型探讨 PI3K/Akt 通路是否对癫痫发作后 GIRK 通道的功能有所调控。本研究发现, $5 \mu\text{mol/L}$  CTZ 孵育海马神经元 48 h 后,海马神经元最大 Kir 电流水平( $-492.80 \pm 57.85$ )pA,较正常海马神经

元( $-1\ 065.0 \pm 264.7$ )pA,明显减少( $P < 0.05$ ,图4A、4B),两者 I-V 曲线也有显著差异( $P < 0.05$ ,图4F),证明 CTZ 孵育后海马神经元 Kir 电流显著减少,痫样放电神经元 GIRK 通道功能降低。为探讨 PI3K/Akt 通路是否能够影响痫样放电神经元 GIRK 通道的功能,本研究利用常用的 2 种 PI3K 抑制剂(wortmannin、LY294002)检测了 CTZ 组痫样放电神经元、CTZ + LY294002 组海马神经元、CTZ + Wort 组痫样放电神经元的 Kir 电流。结果显示,CTZ 组痫样放电神经元的最大 Kir 电流为

( $-492.80 \pm 57.85$ )pA( $n = 12$ ),CTZ + LY294002 组痫样放电神经元的最大 Kir 电流为( $-457.50 \pm 44.03$ )pA( $n = 12$ ),CTZ + Wort 组痫样放电神经元的最大 Kir 电流为( $-500.10 \pm 72.76$ )pA( $n = 10$ ),三者差异无统计学意义(图4C~4E),三者 I-V 曲线比较差异无统计学意义(图4F)。两组 PI3K 抑制剂对痫样放电神经元的 Kir 电流均未产生显著影响,在 CTZ 诱导的痫样放电神经元中利用 PI3K 抑制剂调控 PI3K/Akt 通路对神经元 Kir 电流没有显著改善。

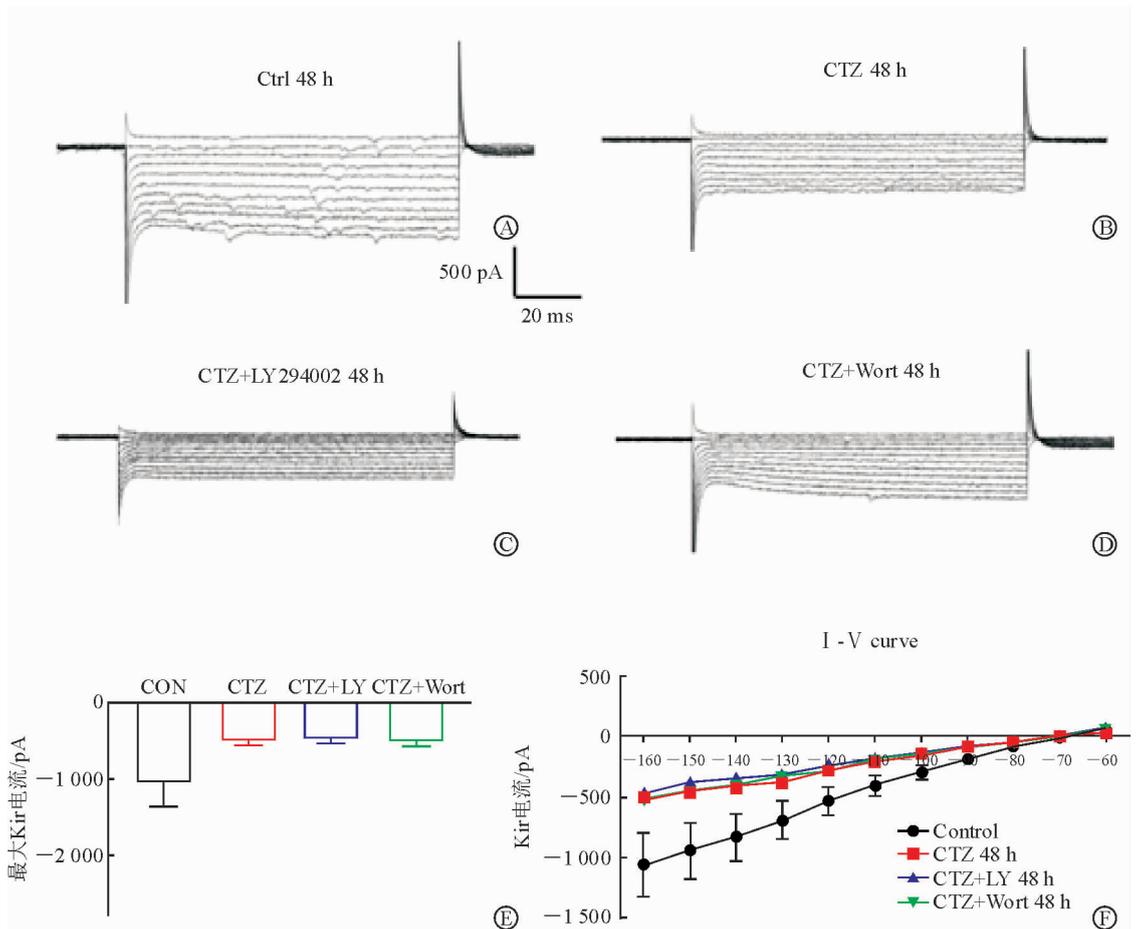


图4 PI3K抑制剂对痫样放电神经元 Kir 电流的影响情况

A~D: control 组神经元、5  $\mu\text{mol/L}$  CTZ 孵育 48 h、5  $\mu\text{mol/L}$  CTZ 和 10  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 共孵育 48 h、5  $\mu\text{mol/L}$  CTZ 和 1  $\mu\text{mol/L}$  wortmannin 共孵育 48 h 的海马神经元 Kir 电流记录原始图;E:各组神经元最大 Kir 电流统计,CON 组与 CTZ 组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),CTZ 组和抑制剂组相比差异无统计学意义;F:各组神经元在不同电压下内向整流钾通道开放程度的 I-V 曲线。

### 3 讨论

钾离子通道参与了神经元静息膜电位的维持和动作电位复极化过程,是维持神经元兴奋性的重要因素,目前已发现多种与癫痫发生相关的钾离子通道基因突变<sup>[15]</sup>。本研究建立了匹罗卡品诱导大鼠癫痫发作模型,发现海马组织膜蛋白 GIRK 通道

亚基表达水平在匹罗卡品诱导大鼠 SE 发作后急性期下调,同时伴随着 PI3K/Akt 通路的激活,而大鼠海马组织膜蛋白 GIRK 通道亚基在 SE 发作后慢性期表达下调,但此时未发现 PI3K/Akt 通路的激活。而在细胞癫痫模型中加用两种 PI3K 抑制剂,均未发现对痫样放电神经元 Kir 电流有明显作用。

研究<sup>[16]</sup>证实 GIRK 通道介导的电流占总 Kir

电流的40%左右,且痫样放电神经元 GIRK 通道介导的 Kir 电流较正常神经元有所降低。癫痫发作之后海马中 GIRK 通道亚基的基因表达有所改变,海马齿状回 GIRK1 亚基的 mRNA 含量在急性电惊厥性休克后降低,而在慢性电惊厥性休克后增加<sup>[17]</sup>。在海人酸诱导的癫痫大鼠海马中也发现,在癫痫慢性期海马齿状回 GIRK1 亚基 mRNA 表达升高<sup>[18]</sup>。既往研究从基因水平和功能水平阐述 GIRK 通道在癫痫发作后的改变,本研究利用大鼠匹罗卡品癫痫模型进一步验证了癫痫发作后海马神经元中 GIRK 通道表达水平的改变。

在海马中 GIRK 通道仅在神经元上表达,因此本研究所检测的 GIRK 通道表达水平能反映海马神经元细胞膜表面 GIRK 通道亚基蛋白表达在癫痫发作后的变化。GIRK2 亚基结构中含有内质网运输模体,在 GIRK 通道从内质网向细胞膜上转运的过程中发挥重要作用,并且 GIRK2 亚基在 GIRK 电流的形成过程中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。GIRK1 亚基虽因缺乏内质网运输模体而无法单独形成功能性的离子通道,但 GIRK1 亚基 C 端 Q404 残基是决定受体依赖的 GIRK 离子通道活性的关键因素,因此 GIRK1 亚基是调节 GIRK 通道功能的重要成分<sup>[20]</sup>。

癫痫发作后神经元细胞膜上 GIRK1 亚基表达减少导致其对 GIRK 通道功能调节能力降低,可能是 Kir 电流在癫痫发作后降低的原因。在痫样放电神经元中,持续癫痫样放电能够引起 caspase-3 依赖的对 GIRK1 和 GIRK2 蛋白的切割,被切割后的蛋白失去装配能力,使得 GIRK 通道与 G 蛋白结合能力下降<sup>[21]</sup>。因此,本研究推测神经元表面 GIRK1 蛋白表达量在癫痫发作后急性期的下降可能是癫痫发作后 GIRK1 基因表达水平改变所致,而神经元表面 GIRK1 蛋白表达水平在癫痫发作后慢性期的降低,可能因慢性期 GIRK 通道亚基在胞质内被切割,从而影响 GIRK 通道在膜上的表达量。

此外,本研究还发现匹罗卡品诱导癫痫发作后急性期的海马中存在 PI3K/Akt 通路的激活。PI3K/Akt 通路参与了多种细胞功能的调控<sup>[22]</sup>。编码 PI3K/Akt 通路有关蛋白的基因(如 PIK3R2、PIK3CA、AKT3 等)突变会导致伴癫痫发作的皮质发育不良等疾病<sup>[23-26]</sup>。在颞叶癫痫患者手术切除的病灶组织中也发现 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达量较非癫痫患者有所增高<sup>[27]</sup>。在海人酸杏仁核注

射、海人酸腹腔注射、戊四氮腹腔注射等多种动物癫痫模型中,也存在癫痫发作后的 PI3K/Akt 通路激活<sup>[28-30]</sup>。在下丘脑 POMC 神经元中,PI3K/Akt 通路的激活抑制 ORL-1 受体介导的 GIRK 通道开放,进而减弱对神经元的兴奋性的抑制<sup>[31]</sup>。因此笔者推测癫痫发作后急性期 PI3K/Akt 通路的激活可能会影响海马神经元膜上 GIRK 通道的表达。PI3K 能够将磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)磷酸化生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3),PIP2 与 GIRK 通道直接结合,促进 GIRK 通道与 G $\beta\gamma$  蛋白的结合从而激活 GIRK 通道<sup>[32]</sup>,癫痫发作后 PI3K/Akt 通路的激活对神经元细胞膜上 PIP2 的消耗可能会影响 GIRK 通道的功能。

本研究进一步利用细胞癫痫模型探究 PI3K 抑制剂是否能够改变癫痫发作后神经元 GIRK 通道的功能,验证了 CTZ 孵育后海马神经元 Kir 电流减少,与之前报道<sup>[33]</sup>相符。有研究<sup>[16]</sup>表明,海马神经元中 GIRK 通道介导的电流约占总 Kir 电流的 50%。因此本研究检测了应用 PI3K 抑制剂后痫样放电神经元总 Kir 电流的变化,以此反映 PI3K 抑制剂对痫样放电神经元 GIRK 通道功能的影响。然而,本研究发现 wortmannin 和 LY294002 对痫样放电神经元的 Kir 电流并未产生显著影响。GIRK 通道的功能受雌激素及雌激素受体调控<sup>[34]</sup>,在其他疾病中发现 PI3K/Akt 通路的激活能调控表观遗传相关分子组蛋白 H3 赖氨酸 4 甲基转移酶(KMT2D),进而影响雌激素受体所介导的基因表达<sup>[35]</sup>,PI3K/Akt 通路的激活可能通过雌激素受体间接影响 GIRK 通道的表达和功能。Jorwal 等<sup>[11]</sup>发现癫痫发作后乳酸水平的变化可能对 GIRK 通道的功能有所影响,Hill 等<sup>[36]</sup>也发现 GIRK 通道参与了腺苷受体 A1R 对癫痫后神经元兴奋性的调控,癫痫发作后 GIRK 通道功能调控的因素复杂,PI3K/Akt 通路可能不是其功能调控的主要因素。

本研究发现,匹罗卡品诱导 SE 发作后急性期海马 GIRK 通道的表达降低,可能与同期 PI3K/Akt 通路的激活有关,PI3K/Akt 通路与癫痫发作后 GIRK 通道表达改变的关系需要进一步研究明确,GIRK 通路在癫痫发作后的调控因素需要进一步探究。

**利益冲突:**所有作者声明不存在利益冲突。

## 参考文献

[1] DEVINSKY O, VEZZANI A, O' BRIEN T J, et al.

- Epilepsy[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018,4(1): 18025.
- [2] HARADA Y, NAGAO Y, SHIMIZU S, et al. Expressional analysis of inwardly rectifying Kir4. 1 channels in Noda epileptic rat (NER)[J]. *Brain Res*, 2013,1517: 141-149.
- [3] INYUSHIN M, KUCHERYAVYKH L Y, KUCHERYAVYKH Y V, et al. Potassium channel activity and glutamate uptake are impaired in astrocytes of seizure-susceptible DBA/2 mice [J]. *Epilepsia*, 2010, 51 (9): 1707-1713.
- [4] HINTERKEUSER S, SCHRÖDER W, HAGER G, et al. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances[J]. *Eur J Neurosci*, 2000,12(6): 2087-2096.
- [5] YAMADA K, JI J J, YUAN H, et al. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure [J]. *Science*, 2001, 292 (5521): 1543-1546.
- [6] YOUNG C C, STEGEN M, BERNARD R, et al. Upregulation of inward rectifier K<sup>+</sup> (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy[J]. *J Physiol*, 2009,587(Pt 17): 4213-4233.
- [7] LUJÁN R, MARRON FERNANDEZ DE VELASCO E, AGUADO C, et al. New insights into the therapeutic potential of Girk channels[J]. *Trends Neurosci*, 2014, 37 (1): 20-29.
- [8] WHORTON M R, MACKINNON R. Crystal structure of the mammalian GIRK2 K<sup>+</sup> channel and gating regulation by G proteins, PIP2, and sodium[J]. *Cell*, 2011, 147 (1): 199-208.
- [9] LÜSCHER C, JAN L Y, STOFFEL M, et al. G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons[J]. *Neuron*, 1997,19(3): 687-695.
- [10] SIGNORINI S, LIAO Y J, DUNCAN S A, et al. Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel GIRK2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94 (3): 923-927.
- [11] JORWAL P, SIKDAR S K. Lactate reduces epileptiform activity through HCA1 and GIRK channel activation in rat subicular neurons in an *in vitro* model[J]. *Epilepsia*, 2019, 60(12): 2370-2385.
- [12] KAUFMANN K, ROMAINE I, DAYS E, et al. ML297 (VU0456810), the first potent and selective activator of the GIRK potassium channel, displays antiepileptic properties in mice[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013,4(9): 1278-1286.
- [13] ZHAO Y, UNG P M, ZAHORÁNSZKY-KÓHALMI G, et al. Identification of a G-protein-independent activator of GIRK channels[J]. *Cell Rep*, 2020,31(11): 107770.
- [14] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972,32(3): 281-294.
- [15] KÖHLING R, WOLFART J. Potassium channels in epilepsy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016,6(5): a022871.
- [16] HUANG Y, ZHANG Y, KONG S, et al. GIRK1-mediated inwardly rectifying potassium current suppresses the epileptiform burst activities and the potential antiepileptic effect of ML297 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 362-370.
- [17] PEI Q, LEWIS L, GRAHAME-SMITH D G, et al. Alteration in expression of G-protein-activated inward rectifier K<sup>+</sup>-channel subunits GIRK1 and GIRK2 in the rat brain following electroconvulsive shock[J]. *Neuroscience*, 1999,90(2): 621-627.
- [18] 王煜,肖波,龙小艳,等. GIRK1,2在慢性颞叶癫痫大鼠海马内的表达变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2004,20(10): 1882-1886. WANG Y, XIAO B, LONG X Y, et al. Altered expression of G protein-coupled inwardly rectifier potassium channels (GIRK) subunit 1 and 2 in hippocampus of chronic temporal epileptic rats induced by kainic acid[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2004,20(10): 1882-1886.
- [19] KUANG Q, PURHONEN P, HEBERT H. Structure of potassium channels[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72 (19): 3677-3693.
- [20] WYDEVEN N, YOUNG D, MIRKOVIC K, et al. Structural elements in the Girk1 subunit that potentiate G protein-gated potassium channel activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012,109(52): 21492-21497.
- [21] BACULIS B C, WEISS A C, PANG W, et al. Prolonged seizure activity causes caspase dependent cleavage and dysfunction of G-protein activated inwardly rectifying potassium channels[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):12313.
- [22] HERS I, VINCENT E E, TAVARÉ J M. Akt signalling in health and disease [J]. *Cell Signal*, 2011, 23 (10): 1515-1527.
- [23] SHI X, LIM Y, MYERS A K, et al. PIK3R2/Pik3r2 activating mutations result in brain overgrowth and EEG changes[J]. *Ann Neurol*, 2020,88(6): 1077-1094.
- [24] KUMARI K, SHARMA M C, KAKKAR A, et al. mTOR pathway activation in focal cortical dysplasia[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020,46: 151523.
- [25] JANSEN L A, MIRZAA G M, ISHAK G E, et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia [J]. *Brain*, 2015,138(6): 1613-1628.
- [26] ALCANTARA D, TIMMS A E, GRIPP K, et al. Mutations of AKT3 are associated with a wide spectrum of developmental disorders including extreme megalencephaly [J]. *Brain*, 2017,140(10): 2610-2622.
- [27] LEWERENZ J, BAXTER P, KASSUBEK R, et al. Phosphoinositide 3-kinases upregulate system x<sub>c</sub><sup>-</sup> via eukaryotic initiation factor 2 alpha and activating transcription

- factor 4-A pathway active in glioblastomas and epilepsy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014,20(18): 2907-2922.
- [28] HUANG Y Z, HE X P, KRISHNAMURTHY K, et al. TrkB-Shc signaling protects against hippocampal injury following status epilepticus[J]. *J Neurosci*, 2019,39(23): 4624-4630.
- [29] ZHU F, KAI J, CHEN L, et al. Akt inhibitor perifosine prevents epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. *Neurosci Bull*,2018,34(2):283-290.
- [30] ZHANG B, WONG M. Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat[J]. *Epilepsia*, 2012,53(3): 506-511.
- [31] CONDE K, MEZA C, KELLY M J, et al. Estradiol rapidly attenuates ORL-1 receptor-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons via Gq-coupled, membrane-initiated signaling[J]. *Neuroendocrinology*, 2016,103(6): 787-805.
- [32] NIU Y, TAO X, TOUHARA K K, et al. Cryo-EM analysis of PIP2 regulation in mammalian GIRK channels[J]. *Elife*, 2020,9:e60552.
- [33] QI J, WANG Y, JIANG M, et al. Cyclothiazide induces robust epileptiform activity in rat hippocampal neurons both *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Physiol*, 2006, 571 (Pt 3): 605-618.
- [34] KELLY M J, QIU J, WAGNER E J, et al. Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS)[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002,83(1-5): 187-193.
- [35] TOSKA E, OSMANBEYOGLU H U, CASTEL P, et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D[J]. *Science*, 2017,355(6331): 1324-1330.
- [36] HILL E, HICKMAN C, DIEZ R, et al. Role of A1 receptor-activated GIRK channels in the suppression of hippocampal seizure activity[J]. *Neuropharmacology*, 2020,164: 107904.

[本文编辑] 王 迪, 贾泽军