

文章编号:1003-2754(2019)04-0374-03

中图分类号:R742.1

AQP4、KCNJ10 基因与癫痫的关联性研究进展

张小冬, 张天丽, 史静综述, 李伟荣审校

关键词: AQP4; KCNJ10; Kir4.1; 癫痫; 基因多态性

癫痫是神经系统第二大类疾病,其发作是由于中枢神经系统“兴奋”和“抑制”两者之间的不平衡而引起的神经元的异常活动。研究者们逐渐发现,脑内神经细胞的兴奋与抑制的失衡,主要与离子通道功能障碍以及神经递质的改变有关。近年来人们对其发病机制的认识已由器官、组织水平逐渐深入到细胞和分子水平。除神经元之外,星形胶质细胞和小胶质细胞也参与了癫痫的发生与发展。众所周知脑内细胞膜上的离子通道是调节神经元兴奋性的结构基础,与癫痫灶起源和扩散关系尤为密切。编码离子通道蛋白的基因一旦发生突变,即可能出现电解质转运和分布的异常,通过影响其膜电位进而引起神经组织兴奋性异常改变,导致癫痫的发生。其中离子通道与癫痫的相关性较为明确(如钠、钾、钙等)^[1]。近年来国内外研究表明,在生理状态下星形胶质细胞中水通道蛋白4(AQP4)及内向整流钾离子通道(Kir4.1)协同调节中枢神经系统的水、电解质的稳态。这两种膜蛋白不仅结构上相似,且在功能也存在一定的耦联关系。已有实验发现两者在癫痫的发病机制以及在癫痫治疗中的耐药性方面发挥着重要的作用。然而也有研究认为钾通道的异常可能是机体对癫痫发作的保护性反应,并非癫痫灶点燃的原因。本文回顾了近年来星形胶质细胞中水通道蛋白4及内向整流钾离子通道在调节神经元兴奋性及癫痫发病的文献,总结AQP4基因、KCNJ10基因在癫痫发病机制中的潜在作用,为抗癫痫的治疗提供新思路。

1 AQP4 基因与癫痫

AQP4 基因由 4 个外显子和 3 个内含子构成,位于染色体 18q11.2 与 18q12.1 之间的连接处。AQP4 蛋白四级结构是具有独立活性的亚单位组成的同源四聚体表达于细胞膜上,其氨基端和羧基端位于胞内,每个亚基含有 6 个疏水性的跨膜 α 右手螺旋结构,以及各亚基间含有 5 个长度不一的连接环[包含 AQP 家族成员共同的特征性结构天冬氨酸-脯氨酸-丙氨酸(NPA)重复串联序列],6 个跨膜区域和 5 个连接环在中线处交叉重叠形成狭窄的开放水分子孔道,即被证实的“沙漏”模型,决定了 AQP4 对水的高通透性并调节水分子的转运^[2]。目前研究发现,水通道蛋白(aquaporins, AQPs)在哺乳动物中共发现 13 种亚型^[3],其中 AQP4 是脑内含量最多且分布最广的类型,主要分布于神经组织的支持细胞,如星形胶质细胞、神经胶质界膜、室管膜等部位,与水分子在脑细胞内的转运有关。其中毛细血管周围的星形胶质细胞的细胞膜是其最主要的表达区域^[4],而在靠近神经毡的一侧则分布较少,这种极性分布的特点有利于水分子在胶质细胞、血液和脑脊液之间进行转运,对脑内水分子代谢平衡调节及

脑脊液产生方面起着重要作用。此外,大量研究发现 AQP4 还参与了星形胶质细胞的诸多生理功能,包括:钙信号传导、神经递质的调节、突触可塑性、神经再生等。因此,AQP4 被认为与中枢神经系统癫痫、脑水肿、脑卒中^[5]、多发性硬化、视神经脊髓炎^[6]、创伤后脑损伤、帕金森病等密切相关。

水分子和钾离子渗透压的改变可以显著影响癫痫的易感性。首先,脑组织兴奋性与细胞外间质(ECS)的渗透压和容积密切相关。ECS 容积缩小可导致神经元过度兴奋并促进痫性放电。相反,ECS 容积增加可抑制痫性放电。另外,研究表明,海马组织中 ECS 内微量的钾离子浓度的增加即易导致痫性放电。难治性癫痫患者中高钾极易导致癫痫发作。目前关于 AQP4 在癫痫致病中的作用机制探讨绝大多数仍来自于对 AQP4 基因敲除小鼠的研究。AQP4 基因切除小鼠是在 1997 年通过 AQP4 靶向基因切除建立的。起初,研究者最早发现 AQP4 基因切除小鼠的听力轻度损害,即脑干听觉诱发电位的阈值增高,并未发现明显的神经功能异常。后来,更多关于 AQP4 基因切除小鼠脑组织生物学特性的研究显示,AQP4 基因敲除的小鼠星形胶质细胞内水分子渗透性较普通小鼠下降了 7 倍。表明了 AQP4 在星形胶质细胞水分子转运过程中起着重要作用。无论是国内还是国外学者,均通过腹腔注射锂-匹罗卡因的方法建立 SD 大鼠癫痫持续状态(SE)模型,动态研究了 AQP4 在大鼠癫痫持续状态后的表达,一致发现 AQP4 在 SE 后脑水肿形成过程中起关键作用,其机制可能与 AQP4 表达上调,通过水分子的转运改变了细胞内外水分子的分布,从而细胞内氯化物、谷氨酸盐等阴离子发生了继发性转运,导致细胞外谷氨酸盐浓度增高,激活富含神经区域神经细胞活动从而诱导癫痫发作有关。然而,一些研究者得出了相反结果,认为 SE 后脑水肿的主要原因是 AQP4 表达下降,Tang 等人^[7]对癫痫持续状态的小鼠在发病 3 h ~ 3 d 小脑 AQP4 表达进行了观察,发现 AQP4 表达水平下降,直至第 7 天才恢复正常水平。猜想研究结果的不一致可能与动物选择、观察时期不同等有关,需要我们进一步实验证实。

颞叶癫痫中约 50% ~ 70% 的患者伴有海马硬化,海马硬化被认为是颞叶癫痫的重要病理改变。研究发现,海马硬化患者的颞叶在头部 MRI 上表现为 T₂ 加权序列及弥散像上高

收稿日期:2018-08-26;修订日期:2019-03-29

基金项目:山西省卫生计生委科研课题(No. 201602006)

作者单位:(山西省太原市中心医院,山西 太原 030009)

通讯作者:李伟荣,E-mail:weironglee@163.com

信号的特点,提示海马硬化组织有水分子增加的迹象。他们对手术治疗过程中海马硬化的脑组织标本进行病理学研究发现,海马硬化区整体 AQP4 含量增高,可能与星形胶质细胞活跃增生有关。另外,美国耶鲁大学 Tih 等学者对伴海马硬化的颞叶癫痫患者的手术切除致痫灶的研究也同样发现:在硬化海马组织中,星形胶质细胞增生显著,AQP4 在 U133A 基因芯片及 QRT-PCR 技术中的表达均上调,提示 AQP4 可能与海马硬化及癫痫发作有关^[8]。

Samira 等人对 AQP4 基因敲除小鼠体外培养过程的研究发现,与野生型小鼠相比,基因敲除小鼠在细胞学形态、增殖及粘附运动方面并无明显差异,但 Transwell 迁移率及创面自愈能力明显低于野生型小鼠;而对野生型小鼠的星形胶质细胞 AQP4 RNA 进行抑制后,它们的迁移率和自愈能力也表现出明显下降,提示 AQP4 可能参与了星形胶质细胞的活化迁移和胶质瘢痕的形成过程^[9]。而星形胶质细胞胶质瘢痕的形成则会造成异常的神经环路形成,从而导致神经网络兴奋性增高诱发癫痫发作,这种异常的神经环路对对抗癫痫药物(AEDs)也具有阻挡作用,这可能是导致癫痫耐药的原因之一。

目前市面上的抗癫痫药物(AEDs)种类繁多,根据其不同的作用机制,分为:(1)增强 GABA 受体兴奋性药物:如丙戊酸钠;(2)减少神经递质释放药物,主要是拮抗兴奋性氨基酸,降低兴奋性递质的活性,如托吡酯;(3)膜稳定剂,主要是作用于电压门控的钠通道,如卡马西平。对临床中常用的抗癫痫药物作用机制进行研究,包括卡马西平、托吡酯等多种抗癫痫药物均具有部分 AQP4 阻断的作用,提示 AQP4 的阻断可能起到一定的抗癫痫作用,可能与阻断 AQP4 的水分子转运,从而抑制了细胞内外离子的继发性转运有关,但仍需进一步研究来证实癫痫发作中 AQP4 的深层作用机制。

2 KCNJ10 基因与癫痫

内向整流钾离子通道(Kir4.1)是一种整合膜蛋白,亦主要由4个亚基构成,每个亚基具有6个跨膜区段,共同构成了K⁺孔道,对钾离子的内流具有高通透性。Kir4.1存在于中枢神经系统胶质细胞内,可由内源性ATP激活,主要功能是将胶质细胞外的钾离子转运至细胞内,对细胞外间质中过量的K⁺浓度进行调节,维持其内环境的稳定。Kir4.1编码基因为位于1q22-q23上的KCNJ10基因,该基因存在于大多数哺乳动物的细胞内。

早期研究表明,癫痫发作时神经元异常放电与细胞内外钾离子异常分布有关,胞外K⁺浓度升高导致细胞膜去极化,从而增高了神经元兴奋性,诱发癫痫发作。当用毛果芸香碱诱发癫痫模型发作时,观察细胞内外钾离子浓度变化,发现,细胞外钾离子浓度的升高可促使神经元兴奋性增高,增加癫痫活动的发生,此时胶质细胞中Kir4.1水平增高,导致钾离子内流,缓冲细胞外过多的钾负荷,抑制了癫痫的发作^[10]。KCNJ10基因作为Kir4.1的编码基因,是小鼠和人癫痫的易患基因,国外Biljana等人对Kir4.1基因敲除小鼠的研究发现,Kir4.1的缺失会引起星形胶质细胞对兴奋性递质谷氨酸的摄入减少,神经网络的兴奋性增强,诱发性发作。

此外,Kir4.1与胶质细胞的发育形成关系密切,敲除Kir4.1基因的小鼠可出现共济失调、癫痫、甚至早期死亡等表现^[8]。在伴有海马硬化及先前有高热惊厥的颞叶癫痫患者的DNA中发现Kir4.1编码基因单核苷酸突变,表明KCNJ10在癫痫易感性中发挥着重要作用。有趣的是,一些研究者发现癫痫与自闭症谱系病(ASDs)有着强烈的关联性。在52例KCNJ10发生突变的隐源性癫痫的患者中发现,2/3的患者伴有2个杂合突变(p.Arg18Gln和p.Val84Met),且与家族癫痫无关。这就表明脑内异常的K⁺渗透压可能会增加自闭症-癫痫表型的易感性^[11]。

中国一项对全面遗传性癫痫(GGEs)患者KCNJ10基因突变与癫痫易感性和药物抵抗关系的研究,分别对284例健康对照组及483例GGEs患者(包括279例抗癫痫药物敏感,204例药物抵抗的患者)KCNJ10基因的8个SNPs进行了分析发现,rs6690889 TC+TT在GGEs组中低表达[6.7% vs 9.5%, $P=0.01$, $OR=0.50(0.29\sim0.86)$]。rs1053074 G等位基因在儿童失神性发作(CAE)中表达频率较健康对照组低[28.4% vs 36.2%, $P=0.01$, $OR=0.70(0.53\sim0.93)$]。rs12729701 G等位基因及AG+GG表型在CAE组中也较健康对照组表达频率低[21.2% vs 28.4%, $P=0.01$, $OR=0.74(0.59\sim0.94)$ and 36.3% vs 48.1%, $P=0.01$, $OR=0.83(0.72\sim0.96)$]。rs12402969 C等位基因和CC+CT表型在GGEs药物敏感性患者中的表达频率高于药物抵抗组[9.3% vs 5.6%, $OR=1.73(1.06\sim2.85)$, $P=0.026$ and 36.3% vs 48.1%, $P=0.01$, $OR=0.83(0.72\sim0.96)$]。该研究表明KCNJ10基因SNPs与癫痫的易感性及抗癫痫药物抵抗有关^[12]。另外,Lenzen PK等人发现KCNJ10等位基因的突变也与全面遗传性癫痫发作有关。然而,是否KCNJ10基因编码的Kir.4异常是癫痫发作的根本病因或是主要原因仍须进一步研究。

目前大部分AEDs均作用于电压门控钠离子通道、钙离子通道或参与GABA递质调节,而作用于Kir4.1等钾离子通道的AEDs少见。综上所述,钾离子通道(包括内向整流及电压门控)对神经元动作电位、兴奋性以及突触可塑性均有一定影响,因此有学者提出:新型抗癫痫药物的研究可以钾离子通道作为药物靶点,为癫痫治疗提供新思路。

3 AQP4 基因及 KCNJ10 基因的关联性

近年来的研究已证实,AQP4与Kir4.1在Maller细胞和星形胶质细胞血管周围终突上呈现极性分布,两者不仅在空间上共表达,而且在功能上也相耦联^[13]。AQP4介导水分子跨膜转运的同时,伴随Kir4.1对细胞外钾离子的缓冲作用,共同参与调节细胞外间质中水、K⁺重新分布,维持脑组织内环境的稳态以及对中枢神经元兴奋性有重要的调节作用。对海马CA₁区AQP4基因敲除小鼠研究显示,AQP4消失后,K⁺清除时间延长,导致了神经元兴奋性增高,诱发癫痫发作。Binder等人^[14]对AQP4基因敲除小鼠颞叶给予致痫刺激后,运用钾敏感的微电极对K⁺变化进行了测量,结果显示K⁺变化曲线的基线及峰值较野生型小鼠基本一致,但由基线上升至峰值及由峰值下降到基线的时间明显延长,出现该

现象的可能原因考虑为: AQP4 的缺失导致细胞内外水分子分布发生了相应的改变, 从而引起 Kir4. 1 对钾离子通透性的改变, 使细胞膜电位发生相应变化, 破坏了细胞外钾离子平衡状态。然而, 一些学者对 AQP4 与 Kir4. 1 功能耦连理论提出质疑, Ruiz-Ederra^[15] 及 Zhang^[16] 等急性分离了 AQP4 基因敲除小鼠中的视网膜 Maller 细胞和星形胶质细胞, 发现 Kir4. 1 的分布和功能特征没有明显改变, 因此他们认为神经胶质细胞中 Kir4. 1 与 AQP4 之间无相关性, 由此看来二者之间的关联性仍需我们进一步研究证实。

4 癫痫与 AQP4 基因、KCNJ10 基因的多态性

颞叶癫痫 (temporal lobe-epilepsy, TLE) 是一种常见的中枢神经系统疾病, 占成人局灶性癫痫发作的 1/3。Kjell Heuser 等对 218 例挪威 TLE 患者进行了研究, 其纳入患者中, 伴海马硬化者 56 例, 高热惊厥者 102 例, 结果表明, AQP4 及 KCNJ10/KCNJ9 基因多态性可能与 TLE, 特别是伴海马硬化者有关^[17] 国内徐仟等人^[18] 通过光镜及透射电镜观察组织学及超微结构, 免疫荧光组织化学法观察星形胶质细胞 AQP4 和 Kir4. 1 的分布特点发现, 不伴有颞叶内侧癫痫的海马组织中, 在星形胶质细胞血管周围 AQP4 和 Kir4. 1 呈现极性分布; 而在颞叶内侧癫痫的海马组织中, AQP4 和 Kir4. 1 的极性分布特点发生改变, 且其分布特点的改变可能与颞叶内侧癫痫发生相关。另一些研究表明: 中枢星形胶质细胞 AQP4 分布的改变, 可以导致细胞水肿, 存在于星形胶质细胞内的氯化物、谷氨酸盐及其它阴离子物质代偿性的通过容积敏感性阴离子通道释放至细胞外, 最终导致细胞外谷氨酸盐浓度增高, 激活神经网络从而激发颞叶癫痫。然而, 牛凤鹤等^[19] 学者对中国汉族人群颞叶癫痫患者的研究发现 KCNJ10 和 AQP4 基因多态性在颞叶癫痫的发生和发展过程无重要作用。这二者研究结果的差异可能与不同人群之间存在异常异质性, 并且 TLE 受诸多易感基因和复杂环境影响有关。一方面, 癫痫的类型众多, 很大一部分癫痫患者与上述两种基因多态性的关系不明确; 另一方面, 研究纳入人群的年龄无特殊限制, 先天遗传因素及后天环境因素与上述两种基因多态性的相关性尚不明了, 因此, KCNJ10 及 AQP4 基因是否相互协同影响癫痫发生仍需要进一步研究证实。

5 展望

癫痫的形成过程复杂, 是多因素共同发展所致。虽然多组证据已表明神经元活动过程中, 胶质细胞中表达的 AQP4 蛋白以及内向整流钾离子通道对水和 K⁺ 渗透压的改变起重要的作用。K⁺ 浓度与癫痫易感性密切相关, 但 AQP4 及 KCNJ10 基因多态性在癫痫发生和发展中的具体作用机制仍需进一步研究。此外, 癫痫发作类型多, 存在多种综合征, 个体间临床差异大, 不同年龄致病因素不同, 因此, 对于不同类型、不同年龄的癫痫患者 AQP4 及 KCNJ10 基因多态性的相关性仍亟待进一步研究。

【参考文献】

[1] 杨华俊, 郭安臣, 王群. 癫痫的发病机制研究进展[J]. 科技导报, 2017, 4: 54-59.
 [2] Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen OP. Aquaporin-4 and epilepsy[J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1203-1214.

[3] Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63: 303-316.
 [4] Costa C, Tortosa R, Domenech A, et al. Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse[J]. *J Chem Neuroanat*, 2007, 33(3): 111-123.
 [5] Vella J, Zammit C, Giovanni GD, et al. The central role of aquaporins in the pathophysiology of ischemic stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 108.
 [6] Pache F, Zimmermann H, Mikolajczak J, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 4: Afferent visual system damage after optic neuritis in MOG-IgG-seropositive versus AQP4-IgG-seropositive patients[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 282.
 [7] Tang H, Chuan S, Jiaquan H. Down-regulated expression of aquaporin-4 in the cerebellum after status epilepticus[J]. *Cogn Neurodyn*, 2017, 11(2): 183-188.
 [8] 周罗, 龙泓羽, 龙莉莉. 中国汉族人群 MVP 基因多态与部分性癫痫耐药的关联研究[C]. 中华医学会第十七次全国神经病学学术会议. 4014. 575.
 [9] Xiao M, Hu G. Involvement of aquaporin 4 in astrocyte function and neuropsychiatric disorders[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(5): 385-390.
 [10] Nagao Y, Harada Y, Mukai T, et al. Expressional analysis of the astrocytic Kir4. 1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model[J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 104.
 [11] Villa C, Combi R. Potassium channels and human epileptic phenotypes: An updated overview[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 81.
 [12] Guo Y, Yan KP, Qu Q, et al. Common variants of KCNJ10 are associated with susceptibility and anti-epileptic drug resistance in Chinese genetic generalized epilepsies[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124896.
 [13] Binder DK, Papadopoulos MC, Haggie PM, et al. In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(37): 8049-8056.
 [14] Binder DK, Yao X, Verkman AS, et al. Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2006, 96: 389-392.
 [15] Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4. 1 potassium channels in retinal Muller cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21866-21872.
 [16] Zhang H, Verkman AS. Aquaporin-4 independent Kir4. 1 K⁺ channel function in brain glial cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 37(1): 1-10.
 [17] Heuser K, Nagelhus EA, Tauboll E, et al. Variants of the genes encoding AQP4 and Kir4. 1 are associated with subgroups of patients with temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsy Res*, 2010, 88(1): 55-64.
 [18] 徐仟, 孙振荣, 李桂林, 等. 人颞叶内侧癫痫海马组织星形胶质细胞水通道蛋白 4 和内向整流性钾离子通道 4. 1 的再分布[J]. 中国康复理论与实践, 2012(3): 215-218.
 [19] 牛凤鹤, 林华, 李景云, 等. Kir4. 1 和 AQP4 基因多态性与颞叶癫痫遗传易感性的关系[J]. 基础医学与临床, 2013(6): 752-756.