丙戊酸钠慢性作用及停药后对 C6 神经胶质瘤细胞 GAT-3 及 GABA-T mRNA 表达的影响

高 杨,雷林生,吴曙光(第一军医大学药物研究所,广东 广州 510515)

摘要:目的 通过研究丙戊酸钠(VPA)慢性作用及停药后对 C6 神经胶质瘤细胞 酌氨基丁酸转运体 -3(GAT-3)和 酌 氨基丁酸转氨酶(GABA-T)mRNA 表达水平的影响,从星形胶质细胞的角度来探讨 VPA 的停药反跳机制.**方法** 用含 50 mg/LVPA 的 DMEM 培养基将 C6 细胞培养 2 周后制成 VPA 慢性作用模型,采用半定量 RT-PCR 方法检测 VPA 慢性作用及停药后对 C6 神经胶质瘤细胞 GAT-3 和 GABA-TmRNA 表达水平的变化.**结果** (1)在 VPA 慢性作用下,相对灰度值(RV 值),即 GAT-3 与 GABA-T 电泳条带与相应的 茁-actin 灰度积分的百分比,为(39.1依5.5)%,低于正常对照组的(46依3.3)%;各停药组的 RV 值均低于 VPA 慢性作用组,其中停药 24 h 组的最低,为(11.7依6.6)%,停药 30min 组的最高,为(38.9依6.6)%;而停药 48 h 组又升高到(33.5依1.1)%.(2)VPA 慢性作用组[RV 值为(71.31依0.91)%]与对照组[RV 值为(34.77依0.26)%]相比,GABA-TmRNA 表达明显上调;各停药组与 VPA 慢性作用组相比,GABA-TmRNA 的表达明显下调,其中停药 12 h 组[RV 值为(25.36依0.68)%]降至最低.**结论** VPA 慢性作用可使 GAT-3mRNA 的表达下调,使 GABA-TmRNA 表达上调.VPA 慢性作用后停药造成的 GAT-3 和 GABA-TmRNA 表达水平的波动可能与 VPA 停药反跳有关.

关键词: 丙戊酸钠;癫痫/药物治疗;C6 神经胶质瘤细胞;酌氨基丁酸转运体;酌氨基丁酸转氨酶

中图分类号: R742.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-2000(2003)09-0885-03

Changes in GAT-3 and GABA-T mRNA expression of C6 glioma cells in response to a 2-week treatment with sodium valproate and withdrawal

GAO Yang, LEI Lin-sheng, WU Shu-guang

Institute of Pharmaceutic Science, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To examine the effects of sodium valproate (VPA) treatment and withdrawal on the expression of GABA transporter-3 (GAT-3) and GABA transaminase (GABA-T) mRNA in C6 glioma cells, and to explore the roleof GAT-3 and GABA-T in the rebound mechanism of VPA withdrawal. **Methods** C6 glioma cells were maintained for 2 weeks in DMEM medium containing VPA (50mg/L) to establish the cell model of chronic exposure to VPA. Semi-quantitative RT-PCR was used to examine the changes of GAT-3 and GABA-TmRNA expression in response to VPA treatment and withdrawal. **Results** Chronic exposure to VPA down-regulated GAT-3 mRNA expression to 39.1%依5.5% from 46%依3.3% in the control group; After VPA withdrawal, GAT-3 mRNA expression level kept decreasing, reaching the minimum (11.7%依6.6%) 24h after the withdrawal and with an increase to the level of 33.5%依1.1% after another 24hr. GABA-TmRNA expression was up-regulated to 71.31%依0.39% from 34.77%依0.36% of the control level after VPA treatment, the withdrawal of which resulted in decreased GABA-TmRNA expression. Till 12h after the withdrawal, the GABA-TmRNA expression level decreased to the minimum, 25.36%依0.68%. **Conclusions** Chronic treatment with VPA can down-regulate GAT-3 mRNA expression and up-regulate GABA-TmRNA expression in C6 glioma cells, and this undulation may involve VPA withdrawal rebound.

Key words: sodium valproate; epilepsy/medicine therapy; C6 glioma cells; GABA transporter-3; GABA transaminase

丙戊酸钠(alproicacid sodium, VPA)是一种常用的广谱抗癫痫药,可有效地提高大脑中主要的抑制性神经递质之一的酌氨基丁酸(GABA)的水平[1],丙戊酸钠需长期规则服用,以保持稳定有效的血药浓度而达到控制癫痫发作的目的.治疗期间如果随意停药或换药过快,轻则病人会出现停药症状,重则导致病情反复甚至加重[2],即停药反跳.此停药反跳机制目前尚不清楚.GABA 作用的程度和持续时间受到 GABA 转运体(GABA transporter, GAT)的调节[3],GAT 可介导高亲和性的与 Na^+/Cl^- 依赖性的 GABA 摄取进入神经末梢和胶质细胞,突起,使突触间隙中 GABA 的浓度保持在一定的水平.目前已知的 GAT 主要包括 GAT-1,GAT-2,GAT-3 三种类型.其中 GAT-3 主要分布在星形胶质细胞的突起上[4],在 GABA 的摄取中起主要作用.被摄取的 GABA 可在 GABA 转氨酶(GABAtransaminase, GABA-T)的作用下转化为琥

收稿日期:2003-05-16

基金项目:广东省医学科研基金(A2002367)

Supported by Medical Science Research Foundation of Guangdong Province (A2002367)

作者简介:高 杨(1967-),男,江苏盐城人,2003 年毕业于第一军医大学,博士,讲师.电话:020-61648167

琥珀酸半醛袁后者再氧化为琥珀酸而进入三羧酸循环噎噎遥C6 神经胶质瘤细胞常用于研究星形胶质细胞的功能和特性噎噎遥因此本实验通过研究 VPA 慢性作用及停药后对 C6 神经胶质瘤细胞 GAT-3 及 GABA-T mRNA 表达水平的影响袁来探讨丙戊酸钠的停药反应机制遥

1 材料与方法

1.1 细胞培养

C6 神经胶质瘤细胞购买于 ATCC 公司袁于 37 益尧5% CO_2 条件下培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基遥

1.2 VPA 慢性作用

VPA 渊Sigma 冤的有效血浆浓度为 50~100mg/L袁本实验采用含 50mg/LVPA 的 DMEM 培养基将 C6 细胞培养 2 周后制成 VPA 慢性作用模型噎噎遥然后将正常 C6 细胞及 VPA 慢性作用的 C6 细胞按 2伊10^5 的密度接种于 35mm 培养皿遥培养 48h 后袁各停药组渊分为停药 30min尧6h尧12h尧24h尧48h 组冤按相应时间停药袁即用不含 VPA 的 DMEM 培养基漂洗 3 遍袁再换以 DMEM 培养基继续培养遥各组在接种后的细胞培养时间均为 96h遥

1.3 RT-PCR

用 Trizol 渊Gibical 冤法提取各组细胞总 RNA袁方法参照 Trizol 试剂说明书遥提取的 RNA 用逆转录酶 AMV 渊Promga 冤尧Oligod T(18mer)等合成 cDNA 第 1 链袁反应条件院42 益 1h袁99 益 5min遥GAT-3 上游引物为 5'-atgtgt gga gtt cca gaagc-3'袁下游引物为 5'-cac acctgtggatcagagag-3'袁扩增片段为 360bp遥PCR 参数为院95 益 30s袁55 益 1min袁72 益 1min袁30 个循环遥上游引物为 5'-aactacgaagagagccgagg-3'袁下游引物为 5'-gag aggatgctgtagtctgg-3'袁PCR 产物为 410bp遥其 PCR 参数为院95 益 30 s袁57 益 1 min袁72 益 1 min袁30 个循环遥内参为 茁actin袁其上游引物为 5'-agc aag agaggcatcctgac-3'袁下游引物为 5'-gtg gtacgaccagag gcata-3'袁扩增产物为 268bp遥同样条件下用无 Rnase 水代替 AMV 作为阴性对照遥实验重复 3 次遥

1.4 结果分析

PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电脉并用 BIO-PROFIL/BIO-CAPT/BIO-1D++ 图像分析软件渊WilberLourmat 公司冤对图像条带进行扫描遥根据各组的 GAT-3 尧GABA-T 的相对灰度值[RV 值袁即 GAT-3 尧GABA-T 电泳条带与相应的 茁actin 条带的灰度积分的百分比值袁V=(VGAT-3/V茁actin)伊100%袁以均数依标准差表示]袁用 Origin7.0 软件作图袁比较各组 GAT-3 和 GABA-TmRNA 表达水平的变化遥

2 结果

2.1 对 GAT-3mRNA 表达的影响

在 VPA 慢性作用下袁V 值为(39.1依5.5)%袁低于正常对照组的(46依3.3)%曰各停药组的 RV 值均低于 VPA 慢性作用组袁其中停药 24h 组的最低袁为(11.7依1.6)%袁停药 30min 组的最高袁为(38.9依6.6)%袁各低于 VPA 慢性作用组曰而停药 48 h 组又升高到 (33.5依1.1)%袁明显高于停药 24h 组渊图 1冤遥

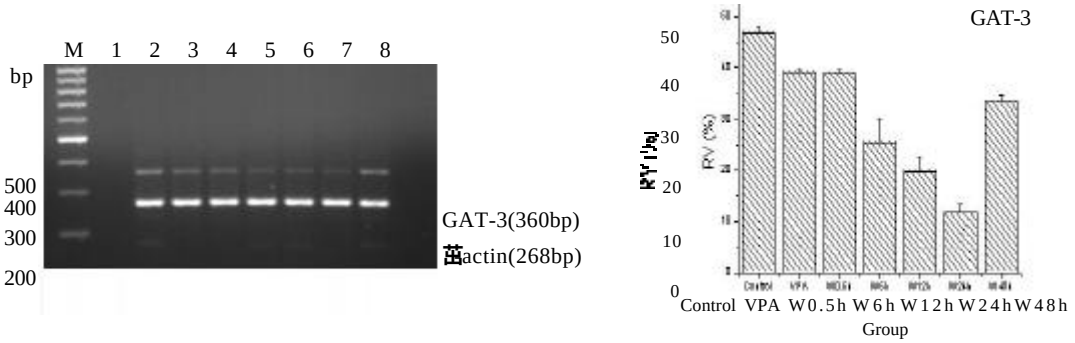

图 1 VPA 慢性作用及停药后对 C6 细胞 GAT-3mRNA 表达的影响

Fig.1 Effects of chronic VPA treatment and withdrawal on GAT-3 mRNA expression in C6 glioma cells

Lane1:Negativecontrol;Lane2:VPA-freeC6glioma(Control);Lane3:ChronictreatmentwithVPA(VPA);Lane4:VPAwithdrawal30min(W-30min);Lane5:VPAwithdrawal6h(W-6h);Lane6:VPAwithdrawal12h(W-12h);Lane7:VPAwithdrawal24h(W-24h);Lane8:VPAwithdrawal48h(W-48h)

2.2 对 GABA-TmRNA 表达的影响

VPA 的慢性作用使 GABA-T mRNA 表达上调袁对照组与 VPA 组的 RV 值分别为 (34.77依6.36)%和(71.31依6.39)%遥与 VPA 组相比袁各停药组 GABA-T mRNA 表达水平明显下降曰除停药 12h 组 [RV 值(25.36依6.68)%]低于对照组外袁其余停药组 GABA-T mRNA 表达水平均高于对照组渊图 2冤遥

3 讨论

GABA 是中枢神经系统中主要的抑制性神经递质袁估计有 60%~75%的突触中存有 GABA袁而 GABA 能神经元功能的损伤造成脑内 GABA 水平低下

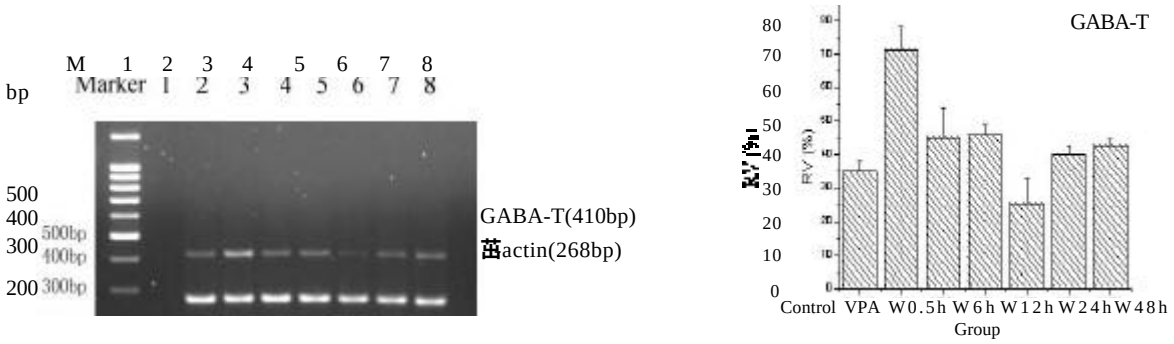

图 2　VPA 慢性作用及停药后对 C6 细胞 GABA-TmRNA 表达的影响

Fig.2　Effects of chronic VPA treatment and withdrawal on GABA-T mRNA expression in C6 glioma cells

Lane1:Negativecontrol;Lane2:VPA-freeC6glioma(Control);Lane3:ChronictreatmentwithVPA(VPA);Lane4:VPAwithdrawal 30min(W-30min);Lane5:VPAwithdrawal6h(W-6h);Lane6:VPAwithdrawal12h(W-12h);Lane7:VPAwithdrawal24h(W-24 h);Lane8:VPAwithdrawal48h(W-48)

与癫痫发生密切相关[1-11]遥长期以来神经科学领域的研究袁包括癫痫相关的病理学和神经药理学研究袁一直集中于神经元上袁而未对神经胶质细胞加以足够的重视遥传统观念认为袁神经胶质细胞是仅仅对神经元具有支持尧营养和保护作用的非兴奋性细胞遥1998 年袁Araque 等[12]首次发现星形胶质细胞可通过释放谷氨酸等化学递质来调节神经元的活动遥现已证明袁星形胶质细胞具有多种电压及配体依赖的离子通道袁含有大部分神经递质尧神经肽尧激素及神经营养因子受体袁并能分泌多种神经活性物质遥因此袁神经胶质细胞尤其是星形胶质细胞的作用日益受到关注遥更考虑到星形胶质细胞在调节突触间隙 GABA 水平上重要的地位袁所以本实验选择 C6 细胞袁从星形胶质细胞的角度来探讨 VPA 停药反跳机制遥本实验结果表明袁VPA 的慢性作用可抑制 GAT-3mRNA 的表达遥停药后 GAT-3mRNA 水平继续下降袁至停药 48h 又开始明显上升遥提示 VPA 通过 GAT-3 调节脑内 GABA 水平可能是其抗癫痫的作用机制之一遥停药后 GAT-3 mRNA 表达的变化可能与停药反跳有关遥GAT-3 一方面可摄取突触间隙中的 GABA袁另一方面又可在一定条件如癫痫状态下逆向运转袁释放 GABA 来调节突触的活动遥因此袁GAT-3 在停药反应中的具体作用仍需进一步研究遥并为今后将 GAT-3 作为一个重要的靶点来开发新的抗癫痫药物提供实验依据遥本实验还观察到 VPA 的慢性作用使 GABA-T mRNA 表达上调袁促进细胞内的 GABA 转变为琥珀酸袁进入三羧酸循环后袁使草酰乙酸生成增加袁这可能会促进草酰乙酸在转氨酶的作用下生成天门冬氨酸[13]遥星形胶质细胞可释放天门冬氨酸袁并可通过 NMDA 受体激活抑制性中间神经元来抑制神经元过度兴奋袁这也许是 VPA 另一抗癫痫作用途径遥停药后 GABA-T mRNA 表达的变化也可能与停药反跳有关袁但仍需深入研究遥

参考文献院

[1] BiggsCS,PearceBR,FowlerLJ, et al. The effect ofsodiumvalproateonextracellularGABAandotheraminoacidsintherathippocampus:an in vivo microdialysisstudy[J].BrainRes,1992,594:138-42.

[2] HarrisJT,RoacheJD,ThorntonJE.Aroleforvalproateinthetreatmentofsedative-hypnoticwithdrawalandforrelapseprevention[J].AlcoholAlcoholism,2000,35(4):319-23.

[3] ChadwickD. Does withdrawalofdifferentantiepilepticdrugshave differenteffectsonseizurerecurrence?FurtherresultsfromtheMRC antiepilepticdrugwithdrawalstudy[J].Brain,1999,122:441-8.

[4] BordenLA,SmithKE,HartigPR, et al.Molecularheterogeneityof the γ-aminobutyricacid(GABA)transportersystem[J].BiolChem, 1992,267(290):21098-104.

[5] MinelliA, Debiasi S, Brecha NC, et al. GAT-3, a high-affinity GABAplasmamembranetransporter, islocalizedtoastrocyticprocesses,anditisnotconfinedtothevicinityofGABAergicsynapses inthecerebralcortex[J].Neurosci,1996,16(190):6255-64.

[6] LebonV,PetersenKF,ClineGW, et al. Astroglialcontributionto brainenergymetabolisminhumansrevealedby ^{13}Cnuclearmagnetic neurotransmitter glutamate repletionand measurementofastrocyteoxidativemetabolism[J].Neurosci,2002,22(5):1523-31.

[7] Cotrina ML, LinJHC,Lopez-GarciaJC, et al. ATP-mediatedglia signaling[J].Neurosci,2000,20(8):2835-44.

[8] WangJF, BowNC, Young LT. Differential displayPCRreveals noveltargetsforthemood-stabilizingdrugvalproateincludingthe molecularchaperoneGRP78[J].MdPharmacol,1999,55(4):521-7.

[9] KinneyGA,SpainWJ.SynapticallyevokedGABAtransportercurrentsinneocorticalglia[J].Neurophysiol,2002,88(34):2899-908.

[10] DurkinMM,SmithKE,BordenLA, et al.Localizationofmessenger RNAsencodingthreeGABAtransportersinratbrain:aninsituhybridizationstudy[J].MolBrainRes,1995,33:7-21.

[11] PatryloPR,SpencerDD,WilliamsonA.GABA uptakeandheterotransportareimpairedinthedentategyrusofepilepticratsandhumanwithtemporallobesclerosis[J].Neurophysiol,2001,85(4):1533-42.

[12] AraqueAC,ParpuraV,SanzgiriRP, et al.Glutamate-dependentastrocyte modulationof synaptic transmissionbetweenculturedhippocampalneurons[J].EurJNeurosci,1998,10(34):2129-42.