

· 论 著 ·

Fmr1 基因敲除小鼠耳蜗的 GABA $\alpha$  1 受体的表达李敏雄<sup>1</sup>, 杜娜<sup>1</sup>, 孙卫文<sup>1</sup>, 黄月玲<sup>2</sup>, 沈岩松<sup>1</sup>, 戴丽军<sup>2</sup>, 陈盛强<sup>1\*</sup>, 马钊恩<sup>1</sup>, 张建国<sup>\*</sup>,

**摘要** :目的 对 4 周龄 Fmr1 基因敲除小鼠耳蜗的 GABA $\alpha$  1 受体表达进行观察,探讨耳蜗 GABA $\alpha$  1 受体的表达是否受 FMRP 的影响。方法 使用 PCR 技术对 Fmr1 基因敲除小鼠鉴定后,对 4 周龄的 Fmr1 基因敲除小鼠和野生型小鼠进行耳蜗的 GABA $\alpha$  1 受体免疫组织化学的表达观察,数据采用多因素方差分析处理。结果 耳蜗 HE 染色结果:4 周龄组 KO 鼠较 WT 鼠形态学观察无差异。4 周龄 KO 小鼠的耳蜗中 GABA $\alpha$  1 受体表达的平均阳性细胞数均低于 WT 小鼠,  $P < 0.01$ , 差异具有统计学意义。结论 GABA $\alpha$  1 受体表达的降低可能与 FMR1 基因 KO 小鼠听源性惊厥发病有关。

**关键词** :耳蜗;GABA $\alpha$  1 受体;Fmr1;听源性惊厥;

**中图分类号** :R-33 **文献标识码** :A **文章编号** :1009-9727(2012)1-9-03

Expression of GABA $\alpha$  1 receptor of cochlea in *FMR1* gene knock-out mice. LI Min-xiong, DU Na, SUN Wei-wen et al. (1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong P. R. China; Corresponding author: ZHANG Jian-guo, E-mail: Entzjg@yahoo.com.cn)

**Abstract** :Objective To observe cochlea morphology and expression of GABA $\alpha$  1 receptor of cochlea in 4 weeks FMR1 KO mice and WT mice. Methods Four-week old Fmr1 knockout mice were identified using the PCR technique and immunohistochemistry to compare with the changes of expression of GABA $\alpha$  1 receptor between FMR1 KO mice and WT mice cochlea. Results There were no difference in cochlea morphology between FMR1 KO mice and WT mice by HE dyeing. The expression of GABA $\alpha$  1 receptor in cochlear in FMR1-KO mice was decreased. Conclusion The expression of GABA $\alpha$  1 receptor is increased in cochlear in four-week old FMR1-KO mice that might be associated with audiogenic seizure susceptibility of Fmr1 knockout mice.

**Key words** :Audiogenic seizures; Fmr1 knockout mice; GABA $\alpha$  1 receptor; Cochlea

遗传性智力低下是神经系统疾病中一类主要的疾病,脆性 X 综合症(Fragile X syndrome, FXS)是最常见的遗传性智力低下性疾病之一,其发病率男性约为 1/1 250, 女性为 1/2 500, 占非特异性智力低下的 2%~6%, 在 X 连锁智力低下中占 40%<sup>[1-2]</sup>。由于 CCG 重复序列扩增和继发启动子区域甲基化的 FMRI 基因沉默,故患者缺少 FMRI(Fragile x gene)蛋白,FMRI 蛋白缺失导致智力低下、行为异常、巨睾症。在此我们使用 PCR 技术对 Fmr1 基因敲除小鼠鉴定后,对 4 周龄 Fmr1 基因敲除小鼠的耳蜗的 GABA $\alpha$  1 受体表达进行观察,探讨耳蜗 GABA $\alpha$  1 受体的表达是否受家族性智力低下蛋白(Family mental retardation protein, FMRP)的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** Fmr1 基因敲除型(KO)纯合子(-/-)及其野生型(WT)纯合子(+/+)FVB 近交系小鼠由荷兰伊拉斯塔斯大学细胞生物学及遗传学研究中心 Oostra BA 教授赠送,广州医学院实验动物中心饲养及繁殖。

所有实验动物的操作及饲养均符合国家标准,遵循人道原则。动物实验前置于实验室 7d 适应环境,室温( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,自由进食和饮水。实验时保持室内安静。选取两个品系 4 周龄小鼠各 15 只进行实验。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物的基因型鉴定** 实验动物的基因型鉴定参照文献<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 染色方法** 采用苏木素-伊红染色(HE)。

**1.2.3 免疫组织化学技术** 选用出生后 4 周各取 6 只,麻醉后取材,置耳蜗于中性福尔马林液(甲醛浓度为 36%)中固定,石蜡包埋,制成 6Lm 的连续切片。石蜡切片脱蜡至水,入 0.03%甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 30min 以封闭内源性过氧化物酶,然后按免疫组织化学 SP 法程序进行染色,第一抗体为兔抗 GABA $\alpha$  1 受体抗体(1:200 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜,生物素标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:300 稀释)室温孵育 3h,SP 复合物(1:300 稀释)室温孵育 2h。以上各步骤之间均用 0.01mol/L PBS pH7.3 洗 5min 3 次, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色

基金项目 广东省自然科学基金项目(No.8151017001000005)

作者单位 1.广州医学院第二附属医院 广东 广州 510260; 2.广州医学院动物实验中心 广东 广州 510182

作者简介 李敏雄(1965~),男,副主任医师,主要从事耳鼻喉科临床、教学、基础研究。

\* 通讯作者 E-mail: Entzjg@yahoo.com.cn

1min, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 应用 Olympus-BH22 型光学显微镜观察并摄相, 阴性对照用 0.01mol/PBS 取代一抗进行孵育, 其余步骤, 条件均相同。结果判断: 阳性表达的细胞胞质被染成棕黄色, 阴性表达的细胞胞质不显色。结果判定按染色细胞的数量比(阳性总体)和染色深度进行定量测定, 染色细胞数量以每只大鼠取 3 张切片, 每张切片随机取 5 个视野, 计数每 5 个视野的阳性细胞数。

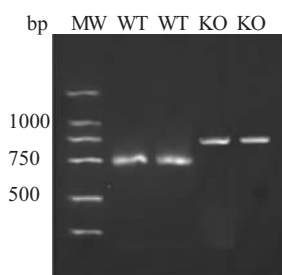
1.3 统计学分析 以上实验结果均使用 SPSS for Windows 10.0 软件完成, 采用多因素方差分析对数据进行分析。

## 2 结果

### 2.1 实验动物模型检测

2.1.1 FMR1 基因敲除小鼠行为学观察 KO 小鼠多动, 易激惹, 喜自残, 同窝小鼠之间常斗殴, 易发癫痫; 雄鼠睾丸较大, 繁殖力差。

2.1.2 实验动物基因型鉴定 KO 和 WT 小鼠基因 PCR 扩增结果如图 1 所示。以 M2 和 N2 为引物, 经 PCR 在 KO 小鼠扩增出约为 800bp 的 DNA 片段; 以 S1 和 S2 为引物, 经 PCR 在 WT 小鼠扩增出约为 500bp 的 DNA 片段。KO 小鼠由于在 FMR1 基因第 5 个外显子中插入了一个新霉素表达片段, 从而阻断了 500bp DNA 片段的扩增, 证实脆性 X 综合征小鼠模型 FMR1 基因的缺陷。



注: 泳道 1 是 DNA 分子量标准物。泳道 2-3 是野生型小鼠 PCR 产物, 泳道 4-5 是 FMR1 基因敲除小鼠 PCR 产物。

Lane 1 DNA marker. Lane 2-3 wild type mouse, Lane 4-5 FMR1 knock out mouse

图 1 KO 和 WT 小鼠 FMR1 基因片段 PCR 扩增结果 (1.5% 琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 1 PCR amplification of Fmr1 gene fragment of KO and WT mice.

2.2 HE 染色结果 通过对 4 周龄 KO 与 WT 小鼠耳蜗的常规 HE 染色, 通过对比观察发现 KO 与 WT 耳蜗结构完整, 鼓阶、前庭阶及中阶内无出血和渗出, 基底膜、Corti 器、螺旋韧带、SGC 血管纹形态正常, SGC 呈椭圆形, 形态规则, 排列紧密, 胞质着色均匀, 胞核大小一致, 大部分可见核仁, 在耳蜗形态结构上无明显差异。(见图 2)

2.3 免疫组化结果 显微镜下见耳蜗组织螺旋神经节细胞 GABA $\alpha$  1 受体在 FVB 小鼠耳蜗玻片螺旋神

经节细胞中成棕褐色免疫信号, 提示 GABA $\alpha$  1 受体主要在细胞的胞体表达 (见图 3)。在耳蜗中, GABA $\alpha$  1 受体的阳性细胞表达 4 周 WT 组的为  $72.48 \pm 27.27$ , KO 组为  $45.71 \pm 8.56$ , 经两独立样本 T 检验,  $P < 0.01$ , 差异具有统计学意义。

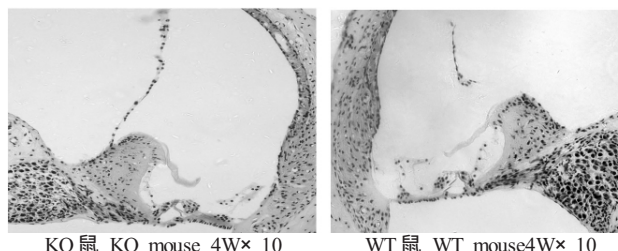
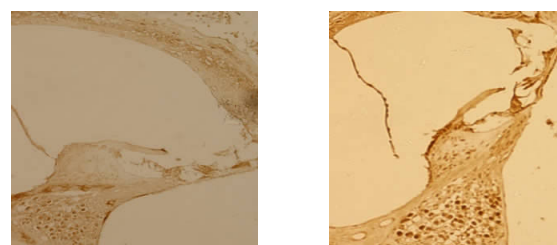


图 2 耳蜗常规 HE 染色

Fig. 2 Conventional staining of cochlea with HE



KO 鼠 GABA $\alpha$  1 受体 4Wx 10 WT 鼠 GABA $\alpha$  1 受体 4Wx 10  
KO mice GABA $\alpha$  1 receptor for 4Wx 10 WT mice GABA $\alpha$  1 receptor for 4Wx 10

图 3 耳蜗 GABA $\alpha$  1 受体免疫染色

Fig. 3 Immunostaining of cochlea receptor GABA $\alpha$  1

## 3 讨论

脆性 X 染色体综合征(FXS)的分子生物学基础是家族性智力低下基因-1(Family mental retardation 1, FMR-1)动态突变, 从而使 FMRP 表达缺陷所致一种疾病。随着对 FMRP 结构和功能的研究深入, 发现 FMRP 与中枢神经某些递质受体表达及脑部解剖结构异常之间存在一定关联, 可能是导致 FXS 患者癫痫发作的原因<sup>[4, 5]</sup>。FXS 患者临床表现多样, 癫痫发作为其常见的临床表现之一, 其发病率为 13.2%~29.2%<sup>[6, 7]</sup>, 明显高于普通人群中癫痫发病率 0.5%~0.7%<sup>[8]</sup>。因此, 有人认为 FXS 可能是癫痫发作的一种新的病因。Fmr1 基因敲除小鼠在行为上和脆性 X 综合征患者非常相似, 最明显的包括自发性运动的增加, 不同程度学习能力低下, 声音诱导癫痫易感性增加等。动物研究<sup>[4, 5]</sup>发现敲除 FMR1 基因的动物可导致其癫痫发作敏感性明显增高, 提示 FXS 的癫痫发作可能与 FMR-1 突变导致 FMRP 缺失有关。此外, 在伴有癫痫的 FXS 动物模型的脑组织切片中发现存在  $\gamma$ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)、代谢性谷氨酸受体及脑组织结构的异常。Huber 等在 FMR1 敲除小鼠模型的大脑中发现海马锥体细胞的突触存在不成熟现象, 提示 FXS 患者 FMRP 表达下降可能导致大脑发育异常或不成熟, 并导致癫痫发作。

我们通过对不同周龄 KO 与 WT 小鼠耳蜗的常规 HE 染色,对比观察 KO 与 WT 耳蜗形态结构的变化,包括 Corti 器、基底膜、前庭阶、鼓阶、中阶、SGC 的数目和形态等。发现不同周龄两种类型的小鼠正常耳蜗结构完整,鼓阶、前庭阶及中阶内无出血和渗出,基底膜、Corti 器、螺旋韧带、SGC 形态正常;高倍镜下 SGC 呈椭圆形,形态规则,排列紧密,胞质着色均匀,胞核大小一致,大部分可见核仁在耳蜗形态结构上无明显差异,由此推测 FMR1 基因敲除小鼠听源性惊厥的发生,可能不是由于形态学的改变引起,可能是由于神经递质、受体的变化等多种复杂原因引起的。但是根据对 FXS 患者行头颅 MRI 检查等临床研究,从大体上发现存在小脑形态异常、丘脑、海马、尾状核体积增加、颞上回体积减小等结构异常及 MRI 密度值改变<sup>[9]</sup>。

本研究选择 GABA $\alpha$  1 受体作为听力学研究的切入点,以探讨 GAD 及 GABA $\alpha$  1 受体在 FMR1 KO 鼠 AGS 和发病机理及其听力学中的作用。Spreafico 等认为癫痫中 GABA 系统的损伤源于 GABA 受体减少<sup>[10]</sup>。本研究发现 FMR1 KO 鼠和 WT 鼠相比,4 周耳蜗 GABA $\alpha$  1 受体阳性细胞表达均减少,结果和以下几个报道相类似,Gantois 等在 FMR1 KO 鼠基因组的研究中发现,FMR1 KO 鼠神经元 cDNA 表达只有三种差别,其中就包括 GABA 受体 A 型的  $\delta$  亚基<sup>[11]</sup>。Idrissi 等研究发现:FMR1 KO 鼠的皮层神经元的 GABA 受体 A 型  $\beta$  亚基 mRNA 也有表达的降低,应用蛋白印迹发现,FMR1 KO 鼠的皮层、海马、丘脑、脑干的 GABA 受体 A 型  $\beta$  亚基表达减少,这也是目前证明 FMR1 KO 鼠在蛋白水平 GABA 受体亚基表达减少的研究<sup>[12,13]</sup>。GABA 受体的减少也可以解释为什么 FMR1 KO 鼠相比 WT 鼠更具有癫痫易感性,有外界的刺激时,比如听源性刺激、热刺激等,其很容易发癫痫,而且在行为学的研究中也发现,FMR1 KO 鼠的敲除小鼠的行为异常,运动性和兴奋性较野生型小鼠增高<sup>[14,15]</sup>。那么为何 FMR1 KO 鼠 GABA 受体表达减少呢? Miyashiro 等研究发现,FMRP 不仅具有对蛋白的负性调控的作用,还具有能和 mRNA 结合,从细胞核运输到细胞质中,并可以定位这些 mRNA,他们使用抗体定位 RNA 的扩增技术 (Antibody Positioned RNA Amplification (APRA)) 对 GABA 受体  $\delta$  亚基进行研究,发现其 mRNA 可以结合到 FMRP 上,FMRP 可以运输和定位其 mRNA,FMR1 KO 鼠由于缺乏 FMRP,这种运输和定位功能的丧失,使得 GABA 受体的表达减少<sup>[16]</sup>。在本研究中发现 FMR1 KO 鼠耳蜗的 GABA $\alpha$  1

受体数目较 WT 鼠明显减少,这可能导致 GABA 在耳蜗中对于内源性和外源性噪音的抑制作用减弱,对听力和言语辨别率降低,从而引起听源性惊厥的发生。

#### 参考文献:

- [1] Warren S.T, Sherman S.L. The fragile X syndrome in the metabolic and molecular bases of Inherited Disease [M]. New York: McGraw-Hill Companies, 2001, 1: 1257-1290.
- [2] Dutch-Belgian Fragile X Consortium. (1994) Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation [J]. Cell, 1994 Jul 15, 78 (1): 23-33.
- [3] Xing Z, Sun WW, Huang YL, et al. Detection of genotype of Fmr1 gene Knocked out mice by using PCR [J]. J Modern Hosp, 2009, 9 (5): 12. (In Chinese)  
(邢州, 孙卫文, 黄月玲, 等. 使用 PCR 方法检测 Fmr1 基因敲除小鼠基因型 现代医院, 2009, 9(5): 12.)
- [4] Bakker, C.E. and Oostra, B.A. Understanding fragile X syndrome: insights from animal models. Cytogenet [J]. Genome Res, 2003, 100, 111-123.
- [5] Kooy R.F. Of mice and the fragile X syndrome [J]. Trends Genet, 2003, 19, 148-154.
- [6] Huber, K.M, Gallagher SM, Warren ST, et al. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 2002, 99, 7746-7750.
- [7] Peter K. Todd, Kenneth J. Mack, et al. The fragile X mental retardation protein is required for type - mentabotropic glutamate receptor - dependent translation of PSD -95. Proc Natl Acad Sci USA, 2003 Nov, 25, 100(24): 14374-14378.
- [8] Hagerman R.J. The physical and behavioral phenotype. In Fragile X Syndrome Diagnosis [The Johns Hopkins University Press][J]. Treatment, and Research, 2002, pp. 3-109.
- [9] Moore C.J, Daly EM, Tassone F, et al. The effect of pre-mutation of X chromosome CGG trinucleotide repeats on brain anatomy [J]. Brain, 2004, 127(Pt 12): 2672-2681.
- [10] Dietrich V, Nieschalk M, Stoll W, et al. Cortical reorganization in patients with high frequency cochlear hearing loss [J]. Hear Res, 2001, 158(1-2): 95-101.
- [11] Gantois I, Vandesompele J, Speleman F, et al. Expression profiling suggests underexpression of the GABA(A) receptor subunit delta in the fragile X knockout mouse model [J]. Neurobiol Dis, 2006, 21 (2): 346-357.
- [12] D'Hulst C, De Geest N, Reeve SP, et al. Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome [J]. Brain Res, 2006, 1121 (1): 238-245.
- [13] El IA, Ding XH, Scalia J, et al. Decreased GABA (A) receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse [J]. Neurosci Lett, 2005, 377(3): 141-146.
- [14] De Vrij FM, Levenga J, der Linde HC, et al. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice [J]. Neurobiol Dis, 2008, 31(1): 127-132.
- [15] Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, et al. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice [J]. Neuron, 2003, 37(3): 417-431.

收稿日期: 2011-10-17 编辑: 谢永慧