

A 型钾通道基因在正常大鼠臂旁外侧核的表达

于 洋 鲜志攀 许春梅 陈雪梅 曹 磊 罗雨晴 张 洁

摘 要 **目的** 探讨 A 型钾通道 5 种亚型即 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.1、Kv4.2 和 Kv4.3 在正常大鼠臂旁外侧核 (lateral parabrachial nucleus, LPB) 的表达。**方法** 分别采用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术检测分布于成年雄性 SD 大鼠 LPB A 型钾通道亚型。**结果** 用 RT-PCR 技术在所有 6 只大鼠 LPB 都检测到了 Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA,但在 1 只大鼠 LPB 未检测到 Kv1.4 mRNA,2 只大鼠 LPB 未检测到 Kv4.1 mRNA;实时荧光定量 PCR 实验显示,在 LPB, Kv1.4、Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA 表达显著高于 Kv4.1 mRNA,而 Kv3.4、Kv4.2、Kv4.3 和 Kv1.4 mRNA 的表达丰度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但在 1 只大鼠 LPB 未检测到 Kv1.4 mRNA。**结论** 在正常大鼠 LPB 中有 A 型钾通道 mRNA 表达,其主要亚型为 Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3。

关键词 臂旁外侧核 A 型钾通道 亚型

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.014

mRNA Expressions of A-type Potassium Channel in Rat Lateral Parabrachial Nucleus. Yu Yang, Xian Zhipan, Xu Chunmei, et al. Department of Physiology, Chengdu Medical College, Sichuan 610500, China

Abstract **Objective** To investigate the mRNA expressions of A-type potassium channel subtypes in rat lateral parabrachial nucleus (LPB). **Methods** The mRNA levels of Kv1.4, Kv3.4, Kv4.1, Kv4.2 and Kv4.3 were respectively detected with RT-PCR and fluorescent quantitative real time PCR. **Results** There were mRNA expressions of Kv3.4, Kv4.2 and Kv4.3 in the LPB of all the tested rats by RT-PCR, while Kv1.4 and Kv4.1 mRNA was not detected in the LPB of 1/6 and 2/6 rats, respectively. With fluorescent quantitative real time PCR, the mRNAs of Kv1.4, Kv3.4, Kv4.2 and Kv4.3 were significantly abundant than that of Kv4.1, while the mRNAs of Kv1.4, Kv3.4, Kv4.2 and Kv4.3 did not show difference, although Kv1.4 mRNA was not detected in the LPB in one of the 6 rats. **Conclusion** The mRNA expressions of A-type potassium channel are detected in rat LPB, where the major subtypes of A-type potassium channels are Kv3.4, Kv4.2 and Kv4.3.

Key words Lateral parabrachial nucleus; A-type potassium channels; Subtype

A 型钾通道属于电压门控型钾通道,包括 5 种亚型,即 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.1、Kv4.2 和 Kv4.3,分别由 KCNA4、KCNC4、KCND1、KCND2 和 KCND3 5 种功能基因编码。A 型钾通道不同亚型在神经元上的定位和在各脑区的分布往往不同^[1]。最近研究发现,臂旁外侧核 (lateral parabrachial nucleus, LPB) 是皮肤温度信号上传通路的重要中继站,在维持体温稳定的前馈体温调节中具有重要作用^[2-5]。前期实验在大鼠 LPB 发现了温度敏感神经元^[6],并观察到升温加快了 LPB 热敏神经元前电位上升速率,而 A 型钾电

流 (A-type potassium current, I_A) 失活加快是前电位上升速率加快的重要机制,但介导 LPB 神经元 I_A 电流的 A 型钾通道亚型尚不清楚。本实验采用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术鉴定分布于成年雄性 SD 大鼠 LPB 的 A 型钾通道亚型,将为后续研究 LPB A 型钾通道及各亚型在 LPB 神经元温度敏感度形成及体温调节中的作用奠定基础。

材料与方法

1. 实验动物:成都达硕实验动物有限公司提供健康成年雄性 SD 大鼠,分别随机抽取 6 只用于 RT-PCR,6 只用于实时荧光定量 PCR 实验,体重 200 ~ 220g。

2. 主要试剂及仪器:Trizol 和琼脂糖由美国 Invitrogen 公司生产;焦碳酸二乙酯 (DEPC) 为美国 Sigma 公司产品;PCR Master Mix 为美国 ThermoFisher 公司产品;RNA Later 为 Life 产品;RNAiso Plus Kit、PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq II Kit、

基金项目:国家级大学生创新创业训练项目 (201413705023);成都医学院大学生创新实验计划项目 (CXXS201406);发育与再生四川省重点实验室研究基金资助项目 (SYS14-004)

作者单位:610500 成都医学院临床医学院 (于洋、鲜志攀、许春梅、陈雪梅、曹磊),公共卫生系 (罗雨晴),生理教研室 (张洁)

通讯作者:张洁,电子邮箱:zhangjiefa8888@126.com

RNA Loading Buffer、RNA Marker RL 1000 和 Gold view II 核酸染料均为大连宝生物工程有限公司生产;戊巴比妥钠、氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氯仿和无水乙醇购自成都科龙化工试剂有限公司。

3. 实验仪器与设备:PCR 仪 (ABI - Veriti96, ABI 美国应用生物系统公司);实时荧光定量 PCR 仪 (PIKORed 96,美国 ThermoFisher 仪器有限公司);电泳仪 (JY200C,北京君意东方电泳设备有限公司);电泳槽 (JY - SPFT,北京君意东方电泳设备有限公司);化学发光凝胶成像仪 (Universal Hood II, 美国 Bio-Rad 公司);紫外分光光度计 (NanoDrop2000, 美国 ThermoFisher 仪器有限公司);热循环仪 (TCA0096, 美国 ThermoFisher 仪器有限公司);低温离心机 (C2500,湖南湘仪实验仪器厂);优普超纯水制造系统 (UPH - II - 10T, 成都超纯科技有限公司);旋涡混合器 (XH - B,江苏康健医疗用品有限公司);电子天平 (PPT - A + 100,美国康州 HZ 电子科技有限公司);手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器 (SYQ - DSX - 280B,上海申安医疗器械厂);微波炉 (MF - 2270EQ, 青岛海尔微波制品有限公司)。

4. 引物设计与合成:根据 NCBI GenBank 中大鼠 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.1、Kv4.2、Kv4.3 和 β - actin mRNA 序列,采用软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计 (表 1 和表 2)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 A 型钾通道 5 种亚型的引物序列 (RT - PCR)			
基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)	
Kv1.4	上游引物 AACCTACCACCCATTTC	356	
	下游引物 AGACTCCTTGACCCCTTC		
Kv3.4	上游引物 TCTCTTCTTCATCTTGCTC	724	
	下游引物 ATTGACGATGACAGGCACAG		
Kv4.1	上游引物 TGAAGAGTACAGGGACCG	598	
	下游引物 GGAAAAGAGGAGAAAAGCC		
Kv4.2	上游引物 ATTGGCGACTGCTGTTATGAG	694	
	下游引物 CTGCAGGGATGCTGCTGAAC		
Kv4.3	上游引物 GACCACTAACCACGAGTTTATT	306	
	下游引物 TTGCAGTTTGCTCTCAGTCCGTC		

5. 实验方法:(1)取材:成年雄性 SD 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (40mg/kg) 麻醉后,迅速断头取脑,在 DEPC 处理过的冰 PBS 液中修块,制备含 LPB 的脑干块,在下丘尾端横断脑干,暴露出一个新月形透明区,即 LPB,小心剥离 LPB,迅速置于 RNALater 中

表 2 A 型钾通道 5 种亚型及 β - actin 的引物序列 (实时荧光定量 PCR)

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
Kv1.4	上游引物 AGGAGGAAGACGAGGAGGAGGAAG	149
	下游引物 ACTGTAGCGGACTGAACTGTAGCC	
Kv3.4	上游引物 CCACGGGGCAATGACCACACC	135
	下游引物 ACACAGCGCACCCACCAGCATTCCT	
Kv4.1	上游引物 GGCACCAGCAAGACCAACTTCACA	164
	下游引物 ACAGGCAAGGCAATGACCAAGACA	
Kv4.2	上游引物 GCCGCAGCGCTAGTCGTTACC	262
	下游引物 TGATAGCCATTGTGAGGGAAAAGAGCA	
Kv4.3	上游引物 CTCCTTAAGCGCGCTCTGTGTCATT	109
	下游引物 CTTCTGTGCCCTGCGTTTATCTGCTCTC	
β - actin	上游引物 GAAGATCAAGATCATTGCTCC	111
	下游引物 TACTCTGCTTGTCTGATCCA	

4℃过夜后, - 20℃保存备用。(2)总 RNA 提取与定量:参照 Trizol 试剂说明书,提取总 RNA 并溶解于 15 μ l 无 RNA 酶水中,紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度, A260/280 = 1.7 ~ 2.0。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶上进行电泳检测 RNA 完整性,可见明亮的 28S、18S 及较淡 5S 条带,无 DNA 污染条带。(3)cDNA 的合成:采用 gDNA Eraser 去除基因组 DNA 后,以 Oligo - dT 为引物,参照 PrimeScript RT reagent Kit 说明书进行反转录,所得 cDNA - 20℃储存备用。(4)普通 PCR 检测目的基因 mRNA 表达:20 μ l PCR 反应体系:10 μ l PCR Master Mix,上、下游引物各 0.4 μ l (10 μ mol/L), cDNA 0.8 μ l,最后加 PCR 水至 20 μ l。反应条件:95℃预变性 5min,然后 94℃ 30s, 52℃ 45s, 72℃ 2min, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 6min。PCR 结束后各取 10 μ l PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (100V $\times$ 30min),电泳结束后使用凝胶仪成像。(5)实时荧光定量 PCR 检测目的基因 mRNA 表达:20 μ l 定量 PCR 反应体系:cDNA 2 μ l,上、下游引物各 0.8 μ l (0.4 μ mol/L), SYBR Primix Ex Taq II (2 $\times$) 10 μ l,加超纯水至反应总体积为 20 μ l。反应条件:95℃预变性 30s;95℃ 5s 变性,55℃ 30s 退火,72℃ 30s 充分延伸,采集荧光 40 个循环。用灭菌水代替模板 cDNA 作为阴性对照;用看家基因 β - actin 作为实时荧光定量 PCR 反应的内参照。根据 PCR 产物的熔解曲线观察实时荧光定量 PCR 反应产物的特异性。分别测定每个样品目的基因和 β - actin mRNA 的临界循环数 (threshold cycle, Ct),每个样品均作复孔以减少操作误差。以 Ct 值表示基因的表达水平,采用相对定量法求得各样本 Δ Ct 值 (目的基因

Ct 值 - 内参基因 Ct 值), 表示样本相对于内参基因的
的表达水平,通过比较各目的基因的 ΔCt 值分析基
因表达的相对差异。 ΔCt 值越高,mRNA 的量越少。

6. 统计学方法:所有数据用 SPSS 19.0 统计软件
数据进行统计分析,均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,
对 A 型钾通道不同亚型 mRNA 表达水平进行单因素
方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. A 型钾通道 mRNA 表达的 RT - PCR 结果:琼
脂糖凝胶电泳结果见图 1。Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3
在 6 只大鼠的所有样品均可见一特异性条带,与预
期扩增片段大小相符,Kv1.4 和 Kv4.1 则分别有 1 只
和 2 只大鼠的样品未见扩增条带,而未加模板的阴性
对照未见任何产物,表明 A 型钾通道 mRNA 在正常
大鼠 LPB 有表达。

2. A 型钾通道 mRNA 表达的实时荧光定量 PCR
结果:(1)PCR 产物的特异性分析:熔解曲线分析显
示,定量 PCR 产物的熔解曲线只有 1 个峰,而且熔解
温度均一,峰形锐利,在反应曲线的其他位置未见到
波形,说明扩增产物为特异性产物,无引物二聚体及
非特异性产物产生(图 2)。(2)A 型钾通道亚型 mR-
NA 表达分析:与普通 PCR 结果基本一致,在 6 只大
鼠的所有样品均检出 Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA

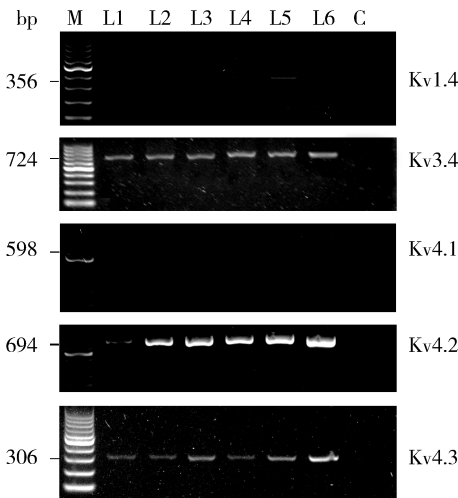


图 1 大鼠臂旁外侧核 A 型钾通道 5 种亚型
mRNA 扩增产物电泳图
M. maker;L1 ~ L6.6 只大鼠臂旁外侧核 mRNA 阳性
扩增产物;C. 阴性对照

表达,但在 1 只大鼠的样品未检出 Kv1.4mRNA,3 只
大鼠的样品未检出 Kv4.1mRNA。A 型钾通道 5 种亚
型 mRNA 的相对含量见表 3。大鼠 LPB 内 Kv1.4、
Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA 表达显著高于
Kv4.1mRNA($P < 0.05$),而 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.2 和
Kv4.3 mRNA 表达丰度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

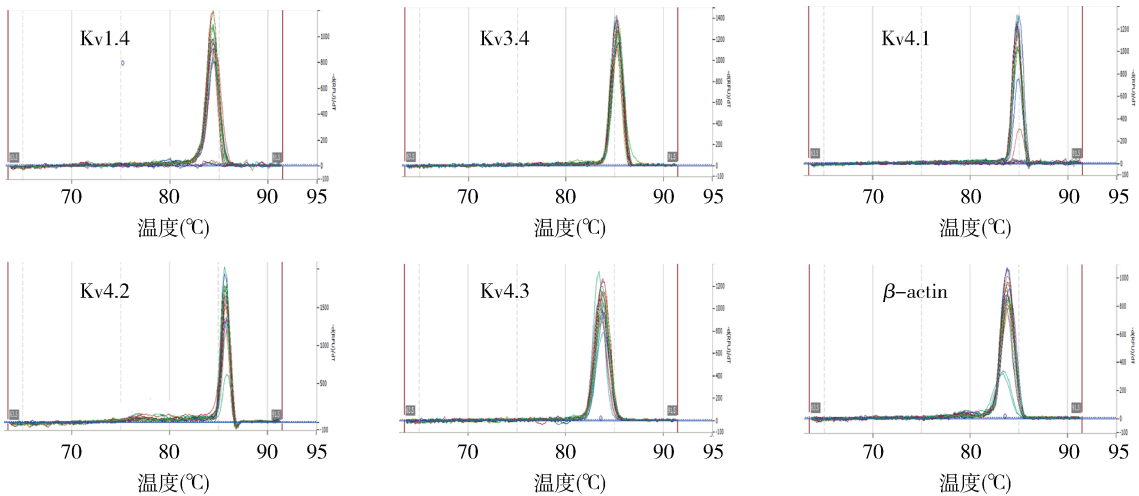


图 2 大鼠臂旁外侧核 A 型钾通道 5 种亚型及 β -actin mRNA 荧光定量溶解曲线

讨 论

A 型钾通道广泛分布于许多类型的神经元上,
其介导的 I_A 电流具有快速激活、快速失活等特征,是
动作电位复极化早期外向电流的主要成分,在调节
神经元放电频率,动作电位的产生以及放电模式等方

面具有重要作用。哺乳动物神经元上存在 5 种 A 型
钾通道亚型,包括 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.1、Kv4.2 和
Kv4.3,除了 Kv3.4 为高电压激活,其余均为低电压
阈值下激活。A 型钾通道不同亚型在神经元上的定
位往往不同,Kv4.1、Kv4.2 和 Kv4.3 主要定位在神经

表3 大鼠臂旁外侧核 A 型钾通道 5 种亚型 mRNA 的相对含量 ($n=6$)

目的基因	Ct		ΔCt
	目的基因	β -actin	
Kv1.4	31.56 ± 2.52	18.13 ± 0.48	$13.44 \pm 2.07^*$
Kv3.4	27.71 ± 1.15	18.13 ± 0.48	$9.59 \pm 0.71^{**}$
Kv4.1	39.23 ± 4.50	18.13 ± 0.48	21.11 ± 4.16
Kv4.2	28.20 ± 0.82	18.13 ± 0.48	$10.08 \pm 0.43^{**}$
Kv4.3	27.89 ± 0.68	18.13 ± 0.48	$9.77 \pm 0.37^{**}$

与 Kv4.1 mRNA 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胞体和树突膜上,且在树突上分布呈向顶树突方向梯度增加的特点,介导了树突型 I_A 电流,在调节突触输入、动作电位起始和反向传播方面具有重要作用;而 Kv1.4 主要分布于神经细胞的轴突和末梢,介导了突触型 I_A 电流,与动作电位的产生和传播有关;Kv3.4 在轴突和树突上均有分布^[1]。A 型钾通道不同亚型在各脑区的分布往往也不同。原位杂交实验显示 Kv4.1 在各脑区信号非常弱,表明 Kv4.1 mRNA 表达水平低,但 Kv4.2 和 Kv4.3 表达水平高,而且都有其特有的分布模式。如 Kv4.2 主要分布在尾核、壳核、脑桥核和延髓核团;而 Kv4.3 主要表达在黑质致密部、压后皮质、上丘、中缝核、杏仁核等^[7]。

采用 RT-PCR 技术,在所有 6 只大鼠 LPB 都检测到了 Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA,但在一只大鼠 LPB 未检测到 Kv1.4 mRNA,两只大鼠 LPB 未检测到 Kv4.1 mRNA,实时荧光定量 PCR 实验显示,在 LPB, Kv1.4、Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA 表达显著高于 Kv4.1 mRNA,而 Kv1.4、Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA 表达丰度无显著性差异,但在 1 只大鼠 LPB 未检测到 Kv1.4 mRNA,3 只未检测到 Kv4.1 mRNA。因此,与其他脑区相似,LPB 内 Kv4.1 mRNA 表达水平低, Kv4.2 和 Kv4.3 mRNA 表达水平高,但不同的是 LPB 内 Kv3.4 mRNA 表达水平也很高,表明 LPB 内的主要亚型除了 Kv4.2 和 Kv4.3,还有 Kv3.4。

LPB 位于小脑上脚的外侧,由形态、空间位置和细胞构筑不同的 7 个亚核组成,即上亚核(LPBs)、内亚核(LPB_i)、中央亚核(LPB_c)、背亚核(LPB_d)、腹亚核(LPB_v)、外亚核(LPB_{el})和最外亚核(LPB_{exl})。

LPB 功能复杂,主要与心血管等内脏活动的调节和感觉信息的传递有关^[8]。近年来,LPB 参与前馈体温调节的作用受到了越来越多的关注。

采用电毁损、形态学、在体电生理学等方法, Nakamura 等证实 LPB 不但是前馈体温调节上传通路的重要中继站,而且不同亚核在前馈体温调节中的作用也不同,LPB_{el}/LPB_c 和 LPB_d 谷氨酸能神经元分别上传由脊髓谷氨酸能神经元传入的皮肤冷、热信号至体温中枢视前区(preoptic area, POA), POA 提前从 LPB 获取皮肤温度感受器传来的前馈信号,在环境温度变化引起体核温度变化前,引发冷、热防御反应,防止体温在过冷、过热环境中发生大幅度波动,维持体温相对稳定^[2-5]。前期实验在大鼠 LPB 发现了温度敏感神经元,并观察到升温加快了 LPB 热敏神经元前电位上升速率^[6]。本实验证实在正常大鼠 LPB 中有 A 型钾通道 mRNA 表达及其主要亚型为 Kv3.4、Kv4.2 和 Kv4.3,这为后续研究 LPB A 型钾通道及各亚型在 LPB 神经元温度敏感形性形成以及体温调节中的作用提供实验依据。

参考文献

- 1 Carrasquillo Y, Nerbonne JM. I_A channels: diverse regulatory mechanisms[J]. *Neuroscientist*, 2014, 20(2):104-111
- 2 Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway that controls body temperature[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(1):62-71
- 3 Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19):8848-8853
- 4 Geerling JC, Kim M, Mahoney CE, *et al.* Genetic identity of thermosensory relay neurons in the lateral parabrachial nucleus[J]. *Am Physiol Regul Integr Com Physiol*, 2016, 310(1):41-54
- 5 Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation[J]. *Adv Physiol Educ*, 2015, 39(3):139-148
- 6 Xue YW, Yang YL, Tang Y, *et al.* In vitro thermosensitivity of rat lateral parabrachial neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 619:15-20
- 7 Serôdio P, Rudy B. Differential expression of Kv4 K^+ channel subunits mediating subthreshold transient K^+ (A-type) currents in rat brain[J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79(2):1081-1091
- 8 Davern PJ. A role for the lateral parabrachial nucleus in cardiovascular function and fluid homeostasis[J]. *Front Physiol*, 2014, 5:436

(收稿日期:2016-03-13)

(修回日期:2016-03-28)