

G 蛋白耦联受体激酶相关蛋白 1 在氯化锂-匹罗卡品致痫模型大鼠海马组织的表达及意义

郑丽华 吴旭玲 陈阳美

【摘要】 目的 观察 G 蛋白耦联受体激酶相关蛋白 1(GIT1)在氯化锂-匹罗卡品致痫模型大鼠海马组织中的表达变化,以探讨 GIT1 在癫痫发生发展过程中的作用机制。方法 共 42 只无特定病原体级成年雄性 Wistar 大鼠,制备氯化锂-匹罗卡品致痫模型,随机分为对照组和癫痫组(癫痫发作后 1、3、7、14、30、60 d),荧光定量聚合酶链反应、Western blotting 法和免疫组织化学染色检测各观察时间点大鼠海马组织 GIT1 表达变化。结果 癫痫组大鼠 GIT1 mRNA 自癫痫持续状态后急性期第 1 和 3 天即升高($P=0.012, 0.002$),至潜伏期第 7 和 14 天持续升高($P=0.003, 0.001$),至慢性期第 30 和 60 天达峰值水平(均 $P=0.000$);GIT1 蛋白自急性期即升高,慢性期持续升高,但与对照组相比,差异未达统计学意义(均 $P>0.05$),至慢性期达峰值水平(均 $P=0.000$)。至慢性期第 30 天时,癫痫组大鼠海马 CA1 区、齿状回和海马旁皮质 GIT1 蛋白表达水平均高于对照组($P=0.000$)。结论 癫痫大鼠海马组织 GIT1 表达上调,可能通过调节细胞骨架动态重组而影响兴奋性神经网络,从而参与癫痫的发生。

【关键词】 GTP 结合蛋白质类; 受体,G-蛋白偶联; 癫痫; 海马; 疾病模型,动物

Expression and significance of GIT1 in hippocampus of lithium-pilocarpine-induced epileptic rats

ZHENG Li-hua¹, WU Xu-ling², CHEN Yang-mei²

¹Department of Neurology, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan, China

²Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

ZHENG Li-hua and WU Xu-ling contributed equally to this study

Corresponding author: ZHENG Li-hua (Email: zlh_engel@163.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression changes of G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1 (GIT1) in lithium-pilocarpine-induced epileptic rat model and explore its role in the genesis and development of epilepsy. **Methods** The lithium-pilocarpine-induced model of status epilepticus (SE) was established in 42 specific pathogen free (SPF) male adult Wistar rats, and those rats were randomly divided into control group and 6 epilepsy groups (1, 3, 7, 14, 30, 60 d after SE). The expression of GIT1 mRNA was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR), while the expression of GIT1 protein was examined by Western blotting and immunohistochemistry was applied to test the expression of CA1 region, dentate gyrus and parahippocampal cortex in rat hippocampus at different time points. **Results** GIT1 mRNA level risen in acute phase on 1st and 3rd day after SE ($P=0.012, 0.002$), then increased continuously in latency on 7th and 14th day ($P=0.003, 0.001$), and reached the peak in chronic phase on 30th and 60th day ($P=0.000$, for all). GIT1 protein expression risen in acute phase and increased continuously in chronic phase, but there was no significant difference compared with control group ($P>0.05$, for all). Then, it reached the peak in chronic phase ($P=0.000$, for all). Until the 30th day, the GIT1 expression of CA1 region, dentate gyrus and parahippocampal cortex in the hippocampus of rats in

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2015.06.011

郑丽华,吴旭玲并列为本文第一作者

基金项目:四川省宜宾市科技计划重点项目(项目编号:2013SF008)

作者单位:644000 四川省宜宾市第二人民医院神经内科(郑丽华);400010 重庆医科大学附属第二医院神经内科(吴旭玲,陈阳美)

通讯作者:郑丽华(Email:zlh_engel@163.com)

6 epilepsy groups was significantly higher than that of control group ($P = 0.000$, for all). **Conclusions** The up-regulated expression of GIT1 in the hippocampus of epileptic rat was probably involved in the formation process of chronic epilepsy by regulating cytoskeleton dynamic regrouping to influence excitatory neural networks.

【Key words】 GTP-binding proteins; Receptors, G-protein-coupled; Epilepsy; Hippocampus; Disease models, animal

This study was supported by Science and Technology Plan Key Project of Yibin, Sichuan Province (No. 2013SF008).

癫痫是一种突发的由大脑神经元高度同步化异常放电所致的中枢神经系统疾病,以短暂性神经功能障碍为特征,常具自限性。异常神经网络的形成是癫痫发生发展的重要病理学机制,神经元细胞骨架重组通过调节神经元树突和轴突可塑性而致异常神经网络形成。研究证实,肌动蛋白细胞骨架重组决定树突棘形态的可塑性^[1-2]。最近也有研究显示,氯化锂-匹罗卡品致病模型小鼠突触后丝状肌动蛋白(F-actin)细胞骨架重组决定树突棘形态的可塑性,促进海马神经元异常环路的过度兴奋传出^[3]。虽然肌动蛋白能调节树突棘形态动态变化,但使其发挥作用的分子信号的具体机制尚不明确。G蛋白耦联受体激酶相关蛋白1(GIT1)是一种衔接蛋白,主要位于兴奋性突触后膜,包括以下几个主要结构域^[4]:位于氨基末端(N末端)的ADP核糖基化因子-GTP酶激活蛋白(ARF-GAP)结构域、3个锚蛋白(ANK)重复结构域、Spa2同源结构域1(SHD1)、卷曲螺旋结构域(CCD)和位于羧基末端(N末端)的桩蛋白结合位点(PBS)。其中ARF是小GTP结合蛋白,可调控细胞膜上受体介导的内吞作用,SHD1与其主要效应分子p21活化蛋白激酶相互作用交换因子(PIX)结合,与下游p21活化蛋白激酶(PAK)和Rho家族GTP酶发生作用。有文献报道,Rho家族GTP酶是调节肌动蛋白细胞骨架动态变化的重要蛋白^[5],推测GIT1在细胞骨架蛋白的调控中发挥重要作用。鉴于此,本研究建立氯化锂-匹罗卡品致病大鼠模型,采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)、免疫印迹法和免疫组织化学染色检测海马组织GIT1表达变化,探讨GIT1通过调节肌动蛋白细胞骨架动态重组参与癫痫发生发展的作用机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 动物来源 无特定病原体(SPF)级6~8周龄

成年雄性Wistar大鼠42只,体重180~220g,由重庆医科大学实验动物中心提供[许可证号:SYXK(渝)2012-0001]。所有实验动物均于恒温20℃、相对湿度50%~60%、12h昼-12h夜循环照明环境中分笼饲养,避免噪声和强光刺激,自由摄食、饮水。

2. 试剂与药品 氯化锂和盐酸匹罗卡品均为美国Sigma公司产品。免疫试剂I抗工作液[包括兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体和兔抗大鼠GIT1多克隆抗体(均为工作液滴度)]分别购自美国Abcam和Santa公司。通用型SP-9001免疫组织化学检测试剂盒[含3%过氧化氢去离子水、封闭用正常山羊血清工作液、生物素标记的山羊抗兔IgG II抗(为工作液滴度)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素],以及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为日本Takara公司产品。全蛋白提取试剂盒由南京凯基生物科技发展有限公司提供。增强型二辛可宁酸(BCA)检测试剂盒、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG II抗和ECL化学发光剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

二、实验方法

1. 动物模型制备与分组 采用随机数字表法将42只大鼠随机分为7组,即对照组和癫痫发作1、3、7、14、30、60d组。癫痫组大鼠腹腔注射氯化锂(127mg/kg),20h后腹腔注射硫酸阿托品(1mg/kg)以拮抗外周胆碱能反应,30min后再腹腔注射盐酸匹罗卡品(35mg/kg)。对照组以等量生理盐水替代盐酸匹罗卡品,其余步骤同癫痫组。参照Racine标准^[6]观察大鼠癫痫发作情况,30min内达IV级以上发作者,发作持续1h后腹腔注射地西洋(10mg/kg)终止发作;30min后仍未达IV级以上发作者,继续追加盐酸匹罗卡品(10mg/kg),10min追加一次,直至

达Ⅳ级以上发作。

2. 荧光定量聚合酶链反应检测总 RNA 分别于癫痫发作后 1、3、7、14、30 和 60 d, 对照组于模型制备后 1 d 各选择 3 只大鼠以质量分数为 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉, 迅速断头切取海马组织, 置-80℃保存备用。海马组织中加入总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus(日本 Takara 公司)于冰上研磨, 严格按照试剂盒说明书提取总 RNA, 于波长 260 和 280 nm 处检测总 RNA 浓度和纯度, 二者光密度比值($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$)为 1.80~2.20 提示总 RNA 纯度合格, 可用于 RT-PCR 反应, 合成 cDNA, 反应条件: 42℃ 15 min、85℃ 5 s, 置-20℃保存备用。PCR 各引物序列为: GIT1 上游引物序列 5'-CCACTTTCCTGCCCTTAC-3'、下游引物序列 5'-CAGATGTCCTGTACCTCAC-3', 内参照物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物序列 5'-CCCCAATGTATCCGTTGTG-3'、下游引物序列 5'-TAGCCGAGGATGCCCTTTAGT-3', 均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。PCR 反应体系: SYBR Green 荧光染料(日本 Takara 公司)5 μl, 去离子水 3.20 μl, 上下游引物各 0.40 μl, cDNA 1 μl, 共 10 μl; 反应条件: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 39 个循环。反应体系自 65℃ 升至 95℃ 行溶解曲线分析(升温速度 0.50℃/次, 12 次/s, 5 s)。计算机自动分析 PCR 检测结果, 计算公式为总 RNA 相对表达量 = $2^{-\Delta CT}(\text{癫痫组})/2^{-\Delta CT}(\text{对照组})$ 。

3. Western blotting 法检测总蛋白 海马组织以全蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 增强型 BCA 检测试剂盒测定总蛋白表达量。先向大鼠海马组织中滴加 1 ml Lysis 缓冲液, 置于冰上玻璃匀浆管中匀浆, 匀浆液置于预冷离心管, 于 4℃、12 000 × g 高速离心 15 min, 取上清液, 即为全蛋白提取物。然后行 SDS-PAGE 电泳分离, 蛋白总量为 50 μg, 250 V 转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 于 37℃ 置 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h, 去除非特异性结合位点。再滴加 I 抗[兔抗大鼠 GIT1 多克隆抗体(1:500)和兔抗大鼠 β-actin 多克隆抗体(1:1000)], PVDF 膜 4℃ 孵育过夜; TBST 缓冲液洗膜 5 min(×4 次), 滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗, PVDF 膜 37℃ 孵育 60 min; TBST 缓冲液洗膜 5 min(×4 次), ECL 化学发光显色。

4. 免疫组织化学染色 分别于癫痫发作后 1、3、7、14、30 和 60 d, 对照组于模型制备后 1 d 各选择剩

余 3 只大鼠以 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉, 迅速断头取出脑组织, 4% 多聚甲醛溶液固定、常规石蜡包埋, 制备层厚 5 μm 的脑组织冠状切片。二甲苯脱蜡、梯度乙醇(100%、95%、80%、75%)复水各 5 min, 置 10 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 值为 6.0), 微波加热沸腾 10 min 修复抗原, 自然冷却至室温, 再以磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次), 0.3% 过氧化氢于 37℃ 孵育 10 min, 去除内源性过氧化物酶。磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次), 体积分数为 0.4% Triton X-100 液 37℃ 孵育 15 min, 正常山羊血清封闭。去除多余血清, 滴加兔抗大鼠 GIT1 多克隆抗体(1:300)50 μl, 4℃ 过夜; 37℃ 复温 30 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次), 滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II, 37℃ 孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次), 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素, 37℃ 孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次), DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 烤干后中性树脂封片。光学显微镜观察大鼠海马组织 GIT1 表达变化, 胞质呈现棕黄色颗粒视为阳性细胞。

三、统计分析方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理与分析。计数资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 两两比较行 Dunnett-t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、行为学观察

大鼠行为学变化参照 Racine 标准^[6]: 0 级, 未出现癫痫发作; I 级, 出现凝视、咀嚼和须动; II 级, 出现点头、湿狗样抖动或搔抓; III 级, 出现前肢阵挛性抽搐发作; IV 级, 出现伴站立的全面性强直-阵挛发作; V 级, 出现伴站立并摔倒的全面性强直-阵挛发作。癫痫组大鼠均达Ⅳ级以上发作, 提示癫痫模型制备成功。地西洋终止发作后至潜伏期, 大鼠表现为精神萎靡、少动、进食少、消瘦, 无自发性癫痫发作; 进入慢性期后, 大鼠出现自发性癫痫发作, 持续时间 ≥ 1 min, 自行终止。

二、海马组织 GIT1 表达变化

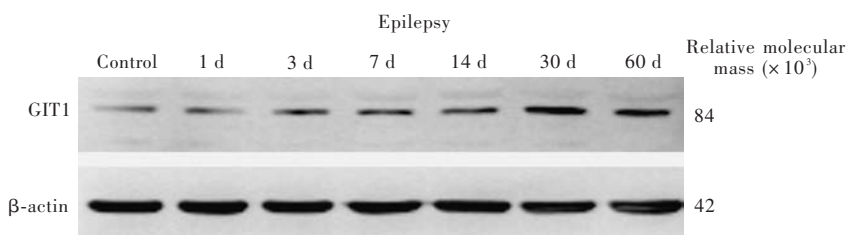
1. 荧光定量聚合酶链反应检测 GIT1 mRNA 表达变化 癫痫组大鼠 GIT1 mRNA 水平自癫痫持续状态后急性期第 1 和 3 天即开始升高, 且高于对照组($P=0.012, 0.002$); 至潜伏期第 7 和 14 天仍高于

表 1 不同处理组大鼠海马组织 GIT1 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of the expression of GIT1 mRNA in rat hippocampus of different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	GIT1 mRNA	F value	P value
Control	3	0.45 ± 0.14		
Epilepsy				
1 d	3	0.86 ± 0.12	12.602	0.000
3 d	3	0.98 ± 0.05		
7 d	3	0.96 ± 0.12		
14 d	3	1.03 ± 0.08		
30 d	3	1.24 ± 0.30		
60 d	3	1.45 ± 0.14		

GIT1, G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1, G 蛋白耦联受体激酶相关蛋白 1。The same as tables below



GIT1, G - protein - coupled receptor kinase - interacting protein 1, G 蛋白耦联受体激酶相关蛋白 1; β-actin, β-肌动蛋白

图 1 Western blotting 法显示, 癫痫组大鼠慢性期 GIT1 蛋白表达水平均明显高于对照组

Figure 1 Western blotting showed the expression of GIT1 in rats of epilepsy groups at chronic phase was significantly higher than that of control group.

对照组($P=0.003, 0.001$); 至慢性期第 30 和 60 天时进一步升高, 达峰值水平, 且显著高于对照组(均 $P=0.000$, 表 1)。

2. Western blotting 法检测 GIT1 蛋白表达变化

癫痫组大鼠 GIT1 蛋白表达水平自癫痫持续状态后急性期第 1 和 3 天即升高, 至潜伏期第 7 和 14 天仍持续升高, 但与对照组相比, 差异未达到统计学意义($P=0.672, 0.237, 0.074, 0.086$); 至慢性期第 30 和 60 天时进一步升高, 达峰值水平, 且显著高于对照组(均 $P=0.000$; 表 2, 图 1)。

3. 免疫组织化学染色检测 GIT1 蛋白表达变化

光学显微镜观察, GIT1 蛋白主要表达于神经元胞质, 至慢性期第 30 天时, 癫痫组大鼠海马 CA1 区、齿状回和海马旁皮质 GIT1 蛋白表达水平均高于对照组(图 2)。癫痫组大鼠 GIT1 蛋白表达水平自癫痫持续状态后急性期第 1 和 3 天即开始升高, 但与对照组相比, 差异未达到统计学意义($P=0.158, 0.242$); 至潜伏期第 7 和 14 天时持续升高, 并且高于对照组($P=0.001, 0.000$); 至慢性期第 30 和 60 天时进一步升高, 达峰值水平, 且显著高于对照组(均 $P=0.000$, 表 3)。

表 2 不同处理组大鼠海马组织 GIT1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, 灰度值)

Table 2. Comparison of the expression of GIT1 in rat hippocampus of different groups ($\bar{x} \pm s$, gray value)

Group	N	GIT1	F value	P value
Control	3	0.34 ± 0.07		
Epilepsy				
1 d	3	0.37 ± 0.05	9.040	0.000
3 d	3	0.43 ± 0.08		
7 d	3	0.48 ± 0.04		
14 d	3	0.47 ± 0.10		
30 d	3	0.67 ± 0.07		
60 d	3	0.65 ± 0.09		

讨 论

阿尔茨海默病、唐氏综合征、癫痫等以认知功能障碍为特点的疾病都有树突棘密度和形态的异常改变^[7-8]。而基于肌动蛋白的细胞骨架动态变化对树突棘形态变化和突触功能执行起重要调节作用。

丝状肌动蛋白是树突棘内最主要的细胞骨架蛋白之一, 是一种处于聚合状态的肌动蛋白, 可以形成肌动蛋白纤维丝, 是调节树突棘可塑性变化的关键蛋白。Sierra-Paredes 等^[9]研究显示, 以丝状肌动蛋白解聚因子 Latrunculin A 对大鼠海马组织进行微量透析, 可以诱导急性癫痫发作和神经元兴奋性的长时程变换, 最终导致慢性自发性癫痫。同时, 有文献报道, 海人酸(KA)和戊四氮点燃癫痫小鼠模型于癫痫持续状态后急性期即发生丝状肌动蛋白表达下调^[10-11]。Zhang 等^[3]研究匹罗卡品致痫模型细胞骨架动态变化时也发现, 丝状肌动蛋白重组出现于自发性癫痫后。上述研究均说明突触丝状肌动蛋白动态变化与癫痫密切相关。丝切蛋白(cofilin)是一种重要的肌动蛋白结合蛋白, 当其 Ser3 位点受到特异性磷酸化酶 LIM 激酶 1(LIMK1)磷酸化后, 即处于

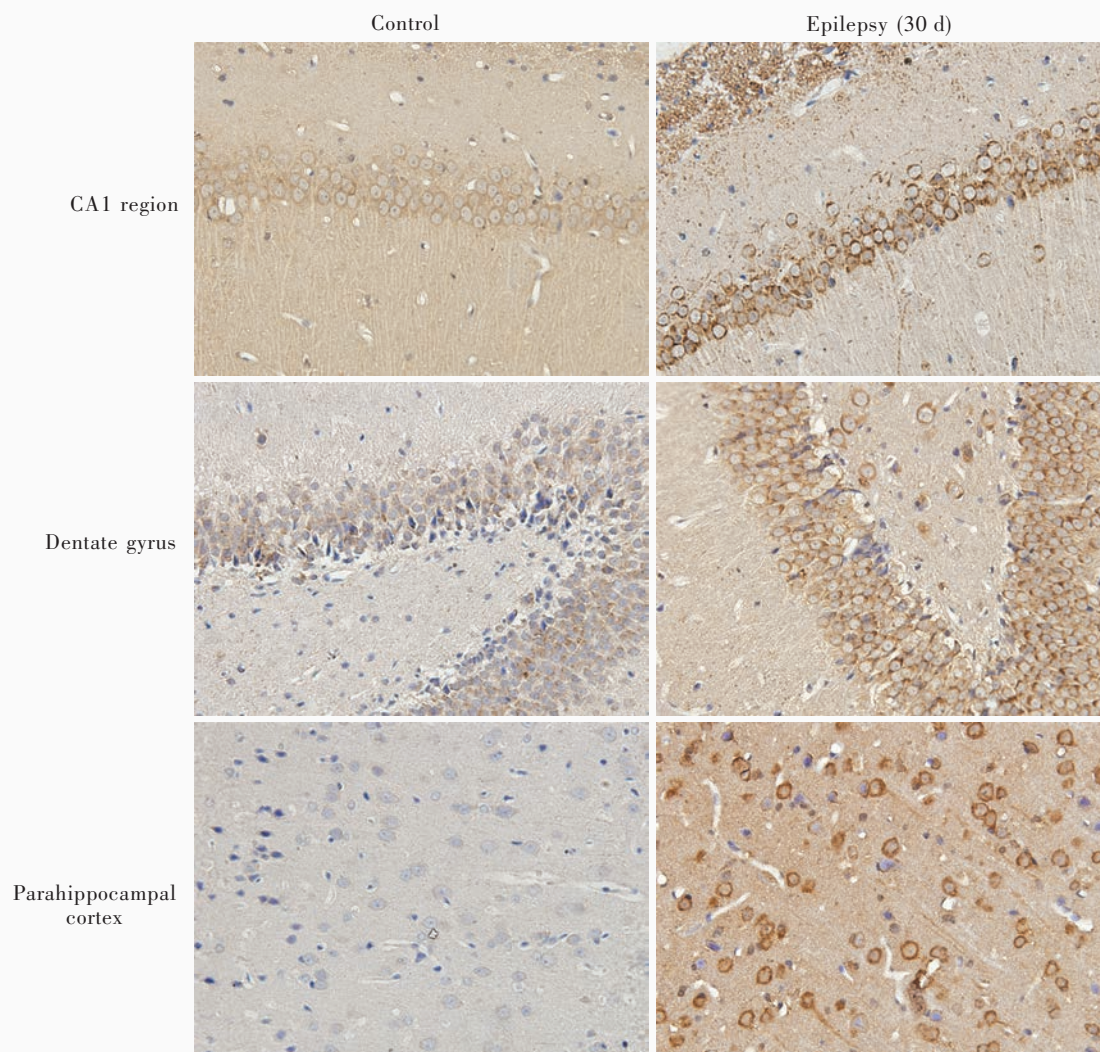


图2 光学显微镜观察显示,至慢性期第30天时,癫痫组大鼠海马CA1区、齿状回和海马旁皮质GIT1蛋白表达水平均高于对照组。免疫组织化学染色(SP两步法)高倍放大

Figure 2 Optical microscopy findings. Until the 30th day, the expression of GIT1 protein in CA1 region, dentate gyrus and parahippocampal cortex in the hippocampus of rats in epilepsy groups was significantly higher than that of control group. Immunohistochemical staining (SP) high power magnified

失活状态,不能使肌动蛋白解聚,导致肌动蛋白纤维丝不断形成,从而促进树突棘生长。

GIT1作为一种肌动蛋白细胞骨架的上游调节因子,在上皮细胞和纤维母细胞的不同亚细胞部位中,通过聚集PIX-p21活化激酶(PAK)等蛋白复合物并与之发生作用,调节细胞运动和迁移。大量研究表明,GIT1在神经元树突棘的形成和突触重塑等生物学过程中具有重要作用^[12-13]。Zhang等^[14]研究发现,干扰突触部位GIT1表达可使海马神经元突触和树突棘数目显著下降。正常情况下,GIT1与其配体PIX相结合,PIX是一种鸟嘌呤核苷酸交换因子,可使Rho家族GTP酶中的Ras相关C3毒素底物

(rac)和细胞分裂周期蛋白42(cdc42)从失活的GDP结合状态向激活的GTP结合状态转化。rac和cdc42均属Rho家族GTP酶成员,是调节肌动蛋白动态变化最具代表性的信号分子^[15-16]。Lieu等^[17]研究发现,在体外培养的分化神经细胞中,GIT1表达上调能够刺激生长相关蛋白43(GAP43)和cdc42表达,推测GIT1/β-PIX/cdc42/PAK信号转导通路在神经元树突棘生长和生物活性方面具有重要作用。此外,钙离子信号转导通路促进海马神经元树突棘和突触生长也是经GIT1介导实现的^[18]。当神经元N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)兴奋性受体受到刺激后,钙离子内流,激活细胞内钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶

表 3 不同处理组大鼠海马组织 GIT1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, 平均 OD 值)

Table 3. Comparison of the expression of GIT1 in rat hippocampus of different groups ($\bar{x} \pm s$, mean OD value)

Group	N	GIT1	F value	P value
Control	3	0.22 ± 0.02		
Epilepsy				
1 d	3	0.27 ± 0.04		
3 d	3	0.26 ± 0.04		
7 d	3	0.33 ± 0.02	30.241	0.000
14 d	3	0.35 ± 0.01		
30 d	3	0.46 ± 0.03		
60 d	3	0.45 ± 0.04		

激酶(CaMKK)和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 I (CaMK I),二者与位于树突棘部位的 GIT1、 β -PIX 相结合,形成一种多蛋白信号复合物,诱导 rac1 激活。Xiao 等^[19]研究显示,GIT1 与 rac1 相互作用而发挥调节功能。在本研究中,氯化锂-匹罗卡品致病模型大鼠海马组织 GIT1 表达水平尤其在潜伏期显著高于对照组,推测 GIT1 过表达使 rac1 不断从失活状态转化为激活状态,其中活性形式的 rac1 占主导地位,当 rac1 活化后可激活下游最主要的效应分子 PAK。PAK 是高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶家族,一方面,其成员 PAK1 和 PAK3 活化可以磷酸化下游肌球蛋白 II 调节轻链的 Ser19 位点,使肌球蛋白收缩,促进树突棘和突触形成^[20];另一方面,PAK1 还可使 LIMK1 磷酸化,使丝切蛋白磷酸化失活,细胞骨架不能有效解聚,不断形成肌动蛋白聚合体,促进树突棘体积和数目增加,形成更多兴奋性突触位点,这些增多的兴奋性突触位点又可以促进神经网络兴奋性环路形成,进一步导致慢性癫痫发生。

综上所述,我们建立氯化锂-匹罗卡品致病模型以观察慢性自发性癫痫的发生,推测 GIT1 通过影响细胞骨架动态变化参与癫痫的形成过程,为探索癫痫发病机制和治疗方法提供了一个新的理论基础。但是,GIT1 表达升高是否是慢性癫痫的关键因素,究竟是原因还是结果,是一个相互促进的过程还是仅为伴随过程,尚待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 1998, 20:847-854.

- [2] Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 2000, 290:754-758.
- [3] Zhang YF, Xiong TQ, Tan BH, Song Y, Li SL, Yang LB, Li YC. Pilocarpine-induced epilepsy is associated with actin cytoskeleton reorganization in the mossy fiber-CA3 synapses. *Epilepsy Res*, 2014, 108:379-389.
- [4] Hoefen RJ, Berk BC. The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci*, 2006, 119:1469-1475.
- [5] Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 2004, 265:23-32.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32:281-294.
- [7] Calabrese B, Wilson MS, Halpain S. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21:38-47.
- [8] Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 39:29-54.
- [9] Sierra-Paredes G, Oreiro-García T, Núñez-Rodríguez A, Vázquez-López A, Sierra-Marcuño G. Seizures induced by in vivo latrunculin A and jasplakinolide microperfusion in the rat hippocampus. *J Mol Neurosci*, 2006, 28:151-160.
- [10] Zeng LH, Xu L, Rensing NR, Sinatra PM, Rothman SM, Wong M. Kainate seizures cause acute dendritic injury and actin depolymerization in vivo. *J Neurosci*, 2007, 27:11604-11613.
- [11] Ouyang Y, Yang XF, Hu XY, Erbayat-Altay E, Zeng LH, Lee JM, Wong M. Hippocampal seizures cause depolymerization of filamentous actin in neurons independent of acute morphological changes. *Brain Res*, 2007, 1143:238-246.
- [12] Hong ST, Mah W. A critical role of GIT1 in vertebrate and invertebrate brain development. *Exp Neurobiol*, 2015, 24:8-16.
- [13] Menon P, Deane R, Sagare A, Lane SM, Zarccone TJ, O'Dell MR, Yan C, Zlokovic BV, Berk BC. Impaired spine formation and learning in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knockout mice. *Brain Res*, 2010, 1317:218-226.
- [14] Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Horwitz AF. Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J Cell Biol*, 2003, 161:131-142.
- [15] Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 2000, 20:5329-5338.
- [16] Tada T, Sheng M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16:95-101.
- [17] Lieu AS, Li JZ, Webb DJ, Hankins GR, Howng SL, Helm GA. Functions of G protein-coupled receptor kinase interacting protein 1 in human neuronal (NT2N) cells. *J Neurosurg*, 2006, 105:103-110.
- [18] Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron*, 2008, 57:94-107.
- [19] Xiao J, Chen X, Xu L, Zhang Y, Yin Q, Wang F. Regulation of chondrocyte proliferation through GIT1-Rac1-mediated ERK1/2 pathway by PDGF. *Cell Biol Int*, 2014, 38:695-701.
- [20] Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, 2005, 25:3379-3388.

(收稿日期:2015-04-10)