

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中的作用

姓名：费玥 学号：21300700011

院系：生命科学学院

专业：生物科学（强基计划）

指导教师：胡长龙 职称：研究员

单位：生命科学学院

完成日期：2025 年 5 月 14 日

Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位 术后脑功能重塑中的作用

完成人

费玥

指导小组成员

胡长龙 研究员

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
一、前言.....	1
1.1 中枢神经损伤与左右颈七交叉移位术.....	1
1.2 Kv2.1 通道与脑内皮层重塑.....	2
二、材料与方法.....	4
2.1 材料.....	4
2.2 试剂.....	4
2.2.1 实验试剂及药品.....	4
2.2.2 实验试剂配方.....	5
2.2.3 实验仪器与设备.....	7
2.3 实验方法.....	8
2.3.1 PCR 方法检验小鼠基因型.....	8
2.3.2 外伤性脑损伤模型（TBI）的建立.....	10
2.3.3 圆筒实验.....	10
2.3.4 旷场实验.....	11
2.3.5 急性脑切片制备.....	11
2.3.6 电极制备.....	12
2.3.7 全细胞膜片钳记录.....	12
2.3.8 数据分析.....	13

三、研究结果.....	14
3.1 PCR 方法检验小鼠基因型.....	14
3.2 Kv2.1_KO 减慢小鼠 CC7 术后前肢使用不对称性恢复.....	14
3.3 Kv2.1_KO 影响 CC7 术后微型兴奋性突触后电流 (mEPSC) 变化.....	16
四、讨论.....	19
参考文献.....	20
致谢.....	23

摘要

中枢神经系统 (CNS) 损伤, 如中风、创伤性脑损伤 (TBI) 和脊髓损伤 (SCI), 是全世界死亡和长期残疾的重要原因。这些损伤通常会破坏下行通路, 阻止皮质命令从大脑一侧传递到脊髓的另一侧, 从而导致持续的运动功能缺陷。目前左右颈七交叉移位 (CC7) 术常被用于治疗急性脑损伤后患者的运动功能障碍。左右颈七交叉移位术是通过将健康侧颈七神经与瘫痪侧颈七神经进行移位连接, 将健康脑半球与瘫痪手之间的神经连接起来, 从而实现一侧大脑同时支配双侧肢体的功能。然而, 该手术介导脑功能重塑的机制研究仍不清楚。

本研究中, 我们以野生型及 Kv2.1 全身性基因敲除鼠为研究对象, 采用动物行为学、脑片膜片钳的技术方法, 使用 TBI 小鼠模型探讨 Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中的作用。研究发现, 在小鼠 CC7 术后前肢使用不对称性恢复过程中, Kv2.1 全身性基因敲除小鼠与野生型不同, 在术后前肢使用不对称性恢复更慢。且 Kv2.1 全身性基因敲除后小鼠皮层 mEPSC 结果显示, Kv2.1 通道可能在 CC7 术后大脑皮层单突触信号传递效率的恢复、大脑皮层功能性突触形成中有重要作用。

综上, 我们的结果表明 Kv2.1 通道在 CC7 术后大脑皮层功能恢复中有重要作用, 揭示了 Kv2.1 通道大脑皮层功能性突触中的潜在影响, 为中枢神经损伤的治疗提供了新的思路。

关键词: 中枢神经系统 (CNS) 损伤, 左右颈七交叉移位 (CC7) 术, Kv2.1 通道, 大脑皮层

Abstract

Central nervous system (CNS) injuries, such as stroke, traumatic brain injury (TBI), and spinal cord injury (SCI), are major causes of mortality and long-term disability worldwide. These injuries typically disrupt descending pathways, blocking the transmission of cortical commands from one hemisphere of the brain to the contralateral spinal cord, thereby leading to persistent motor function deficits. Currently, the contralateral cervical seventh cross transfer (CC7) surgery is commonly used to treat motor dysfunction in patients after acute brain injuries. This procedure connects the healthy cervical seventh nerve to the paralyzed side, bridging neural pathways between the healthy cerebral hemisphere and the paralyzed hand, enabling unilateral brain control of bilateral limbs. However, the mechanisms underlying CC7 surgery-mediated cerebral functional remodeling remain poorly understood.

In this study, we employed wild-type mice and Kv2.1 global knockout mice, along with behavioral assessments and brain slice patch-clamp recordings, to investigate the role of Kv2.1 channels in post-CC7 surgery cerebral functional remodeling using a TBI mouse model. The findings revealed that during the recovery of forelimb usage asymmetry after CC7 surgery, Kv2.1 knockout mice exhibited slower restoration of asymmetric forelimb function compared to wild-type mice. Additionally, cortical mEPSC analysis in Kv2.1 knockout mice suggested that Kv2.1 channels may play a critical role in restoring monosynaptic signal transmission efficiency and promoting functional synapse formation in the cerebral cortex post-CC7 surgery.

In summary, our results demonstrate the significant contribution of Kv2.1 channels to post-surgical functional recovery in the cerebral cortex and uncover their potential influence on cortical synaptic plasticity. This study provides novel insights into therapeutic strategies for CNS injuries.

Keywords: Central nervous system (CNS) injuries, contralateral cervical seventh

cross transfer (CC7) surgery, Kv2.1 channel, cerebral cortex

一、前言

1.1 中枢神经损伤与左右颈七交叉移位术

中枢神经系统(CNS)损伤,如中风、创伤性脑损伤(TBI)和脊髓损伤(SCI),是全球导致死亡和长期残疾的重要原因之一。据统计,全球每年有16900万人首次中风,其中约3300万人次幸存^[1]。这些幸存者中约有80%患有上肢运动障碍,使中风成为成人获得性残疾的主要原因之一^[2,3]。

中枢神经系统损伤通常会破坏下行通路,临床研究发现,一侧大脑半球损伤后,损伤会阻止皮质命令从大脑一侧传递到脊髓的另一侧,从而导致持续的运动功能缺陷^[4]。绝大多数患者的对侧肢体会表现出永久性功能障碍,这严重影响了患者的生活水平。

过去损伤急性期后的康复通常采用物理治疗或药物干预,如使用无创脑刺激(NIBS)技术、经颅磁刺激(TMS)或经颅直流电刺激(tDCS)监测和调节皮层内神经元回路的兴奋性,或使用约束诱导运动疗法(CIM)提高干预后在麻痹手臂的运动功能、肌肉张力、手臂手活动等^[5-7]。尽管这些早期干预可以改善粗大运动,但大多数患者患手灵活和熟练的运动,例如抓握或操纵物体,仍然受损^[5,6]。且大多数患者的恢复在受伤后的前3-6个月内,在受伤后6个月后,神经功能通常趋于稳定,难以进一步恢复^[7,8]。

《新英格兰医学杂志》上曾刊登猜想:“大脑的一侧足以保证身体两侧的功能完整性”。接受半球切除术治疗顽固性癫痫的婴儿和儿童可以逐渐重建对侧肢体的运动和感觉^[9,10],也有研究证明了中风后恢复手部灵活性运动过程中对侧半球的参与,如皮质活动确实与对侧手臂的肩外展负荷程度成正比地向对侧半球移动^[11]。且中风后发育性脑干反射的重新出现,表明解剖学上弥漫性网状脊髓运动通路在协同表达过程中是活跃的,这可能是一种适应性策略,以牺牲精细运动控制为代价来保持低水平运动控制^[12,13]。这些发现表明,利用对侧半球的潜力是治疗单侧痉挛性手臂麻痹的潜在方向。

第七颈神经可以同时支配感觉和运动功能,左右颈七交叉移位术通过将健康侧颈七神经与瘫痪侧颈七神经进行移位连接,将健康脑半球与瘫痪手之间的神经连接起来,从而实现一侧大脑同时支配双侧肢体的功能。术后随访发现,左右颈

七交叉移位术显著改善了患侧肢体感觉、运动功能^[14]。目前左右颈七交叉移位术常被用于治疗急性脑损伤后患者的运动功能障碍，而 CC7 手术引起的功能恢复不仅限于 C7 神经本身支配的功能，还可以用于治疗儿童脑瘫患者、实现中老年脑卒中患者的康复等^[15]。尽管该手术在臂丛神经损伤（BPI）和脑损伤的临床治疗中都取得了实质性的康复，但手术背后的神经机制仍然知之甚少。

已有研究中，常常使用创伤性脑损伤（TBI）小鼠模型探讨 CC7 手术后瘫痪前肢熟练运动功能恢复的底层机制。TBI 小鼠模型一般使用电皮质挫伤撞击器（eCCI）损伤成年小鼠的左半球大脑皮层导致单侧脑损伤，2 周后，解剖结构证实这种 TBI 协议几乎破坏了启动运动的重要位置：感觉运动皮层^[14]。这些患有单侧 TBI 的小鼠表现出明显的右前肢运动缺陷。

CC7 手术通过促进皮质脊髓束（CST）在反侧感觉运动皮层中的轴突发芽来改善熟练的运动功能，TBI 后小鼠受影响的前肢功能明显自发恢复，但一些与 CST 密切相关的熟练运动功能无法恢复^[16, 17]。故而与其他模型（如锥体切开病变）相比，TBI 可以更好地模拟单侧皮质病变后的病理状态，并有助于更好地研究对侧半球的重塑^[18]。

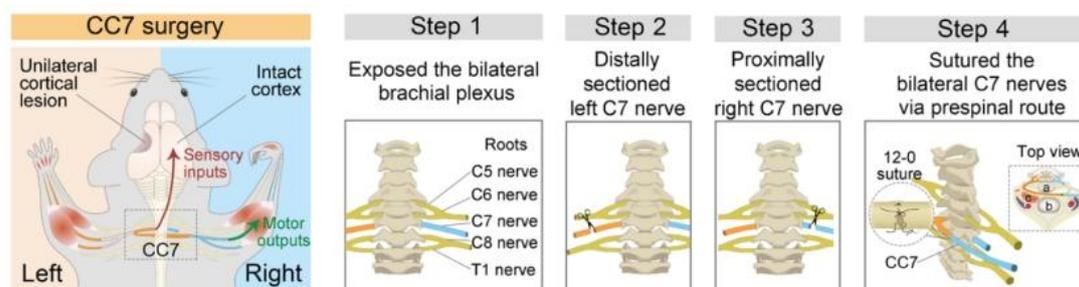


图 1.1 小鼠交叉神经转移手术示意图^[14]

1.2 Kv2.1 通道与脑内皮层重塑

由 Kv2.1 和 Kv2.2 组成的 Kv2 通道家族在控制神经兴奋性方面起着重要作用^[19]。Kv2.1 通道在整个哺乳动物大脑中广泛表达，是皮层和海马神经元整流钾电流的主要传导者，在所有皮层中均始终保持高表达^[20, 21]。实验室观察发现以及先前的文章报道也指出，Kv2.1 通道全身性敲除小鼠活跃度与野生型小鼠相比明显提高，在旷场和高架十字实验中表现出更高的探索欲望和更低水平的焦虑样行为，提示 Kv2.1 通道在小鼠的运动过程中发挥着重要作用。

Kv2.1 在整个哺乳动物大脑神经元的胞体和近端树突上的高水平表达，神经元活性改变会引发钙调磷酸酶依赖的 Kv2.1 去磷酸化过程，导致通道在质膜上的簇状分布重组，进而改变其介导的延迟整流钾电流幅值，有效且可逆地调控了神经元动作电位，以此来调节内在兴奋性，位于 CA1 海马神经元树突状膜中的 Kv4.2 A 型通道已被证明可调节局部膜兴奋性^[22]。在出生后小鼠大脑中，巨大网状神经元中的高频动作电位序列的与触发皮质觉醒相关，这些动作电位序列依赖于延迟整流器，特别是 Kv2.1^[23]。这些都提示了 Kv2.1 的活性依赖性调节，可能在皮层激活或脑内皮层重塑时发挥作用。

细胞膜上的 Kv2.1 通道有两种形式：簇状和非簇状。非簇状 Kv2.1 通道能正常传导 K⁺，对维持神经元动作电位的重复性发放至关重要。簇状的 Kv2.1 通道几乎不导电，已被证明可作为组织神经元内质网/质膜(ER/PM)连接的平台^[24, 25]。ER/PM 连接对真核细胞的脂质和 Ca²⁺平衡至关重要，且在哺乳动物脑神经元的胞体特别丰富^[26]。最近的研究表明，簇状的 Kv2.1 通道招募 Cav1.2 到胞体 ER/PM 连接处，形成 Ca²⁺信号微域，控制胞体 Ca²⁺信号，调节海马神经元的兴奋-转录耦合，实现基因表达的调控^[27]。

颈七交叉移位术不仅重塑了感觉皮层的功能连接，还促进了运动皮层的重新映射。已有的根据皮层图谱，通过光遗传学方法对疾病模型和术后模型小鼠进行运动诱发电位测量，发现术后模型小鼠的患侧肢体在手术后 8 周呈现出更广泛的运动反应区域，并在 12 周时集中于 CFA 的 S1 区^[14]。但变化的具体机制还有待研究。

实验室前期通过使用膜片钳电生理记录结合单细胞定量 RT-PCR 的方法对左右颈七交叉移位术后 S1 区不同神经元的变化进行探究。对 S1 区有明显电生理变化的 2/3 层神经元进行了单细胞定量 RT-PCR 实验，发现这些神经元的 Kv2.1 通道基因有显著提高，并且通道电流也有明显增大。这提示了 Kv2.1 可能参与了左右颈七交叉移位术后 S1 区基因表达和神经元特性的变化。

二、材料与amp;方法

2.1 材料

本课题中的实验动物选用 8 周龄的雄鼠，体重约为 20~25 g/只，品系为 C57BL/6N，以同窝出生的同龄野生型小鼠作为对照组开展实验。Kv2.1 敲除鼠由赛业(苏州)生物公司提供。本课题涉及的动物实验严格按照复旦大学生命科学学院伦理委员会标准进行。

2.2 试剂

2.2.1 实验试剂及药品

表 2.1 试剂与药品信息

试剂	公司	国家
氯化钾 (KCl)	Merck	德国
磷酸氢二钠 (NaH ₂ PO ₄)	Merck	德国
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	Merck	德国
4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)	Merck	德国
葡萄糖 (Glucose)	Merck	德国
硫酸镁 (MgSO ₄)	Merck	德国
氯化钙 (CaCl ₂)	Merck	德国
氯化钠 (NaCl)	Merck	德国
蔗糖 (Sucrose)	Merck	德国
葡萄糖酸钾 (K-gluconate)	Merck	德国
ATP 镁盐 (Mg-ATP)	Merck	德国

GTP 三钠盐 (Na ₃ -GTP)	Aladdin	中国
抗坏血酸 (Ascorbic acid)	生工生物	中国
丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	Vetec	德国
Trizma 盐酸缓冲液 (Tris Hcl)	Sigma	德国
蛋白酶 K (Proteinase K)	Merck	德国
Triton X-100	Sigma	德国
Premix Taq 聚合酶	Vazyme	中国
DNA Marker (100 bp)	Thermo Scientific	美国
琼脂糖 (Agarose)	BIOWEST	法国

2.2.2 实验试剂配方

表 2.2 脑组织切片液

试剂	浓度 (mM)
Sucrose	210
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25
NaHCO ₃	25
Glucose	7
MgCl ₂	7
CaCl ₂	0.5
Ascorbic acid	1.3

Sodium pyruvate 3

调 pH 至 7.4, 渗透压调整至 305 mOsm / L

表 2.3 人工脑脊液

试剂	浓度 (mM)
NaCl	125
NaHCO ₃	25
Glucose	12.5
CaCl ₂	2
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1
MgCl ₂	2
Ascorbic acid	1.3
Sodium pyruvate	3

pH 调整为 7.4, 渗透压调整至 315mOsm / L

表 2.4 微型兴奋性突触后电流 (mEPSC) 记录内液

试剂	浓度 (mM)
K-gluconate	120
EGTA	0.4
HEPES	10
Mg-ATP	2

Na3-GTP 0.3

KCl 10

pH 调整至 7.3, 渗透压调整至 305mOsm / L

2.2.3 实验仪器和设备

表 2.5 主要仪器设备

仪器	公司	国家
电子天平 (FA1004N)	菁华科技	中国
pH 仪 (FE28)	Mettler Teledo	瑞士
渗透压仪 (OSMOMAT3000)	Gonotec	德国
振动切片机 (DTK-1000)	DOSAKA	日本
精密恒温水浴锅 (SY-1210)	精骐	美国
电极拉制仪 (MODELP-97)	SUTTER	美国
正置相差显微镜 (Olympus BX51)	OLYMPUS	日本
膜片钳放大器 (MultiClamp 700B)	Molecular Devices	美国
数模转换器 (Axon Digidata 1550B)	Molecular Devices	美国
微操纵仪 (MP-225)	SUTTER	美国
防震台 (ZDT12-075)	连胜光学平台	中国
数显恒流泵 (HL-2B)	沪西分析仪器厂	中国
空气压缩机 (QD8204)	嘉兴市民建机械厂	中国
电子大脑皮质挫伤撞击仪 (eCCI)	上海玉研仪器	中国

表 2.6 实验软件

软件	公司	国家
Q-capture	Teledyne Photometrics	美国
Clampex10.7	Molecular Devices	美国
MultiClamp700B	Molecular Devices	美国
Clampfit10.7	Molecular Devices	美国
GraphPad Prism8.0	GraphPad Software	美国

2.3 实验方法

2.3.1 PCR 方法检验小鼠基因型

1) 待检验小鼠的基本信息如下:

表 2.7 小鼠基本信息

品系名称	C57BL/6N-Kcnb1em1C/Cya
序列号	KOCMP-16500-Kcnb1-B6N-VB
目标基因	Kcnb1 (NCBI ID: 16500)
基因编辑类型	常规敲除 (Conventional Knockout)
背景品系	C57BL/6N

2) 引物设计

a. 引物组 1 (退火温度 60.0 °C):

F1: 5'-CAGTGAGATACAAATTGTGTGTGGT-3'

R1: 5'-AATACTGAATCATTGAGCCGCTG-3'

预期产物: 657 bp (敲除纯合子)

b. 引物组 2 (退火温度 60.0 °C)

F2: 5'-CAGTACATAGACACCGACACTGAT-3'

R1: 5'-AATACTGAATCATTTGAGCCGCTG-3'

预期产物: 817 bp (野生型)

c. 基因型判定

表 2.8 小鼠基因型判定

基因型	引物组 1 产物	引物组 2 产物
纯合子 (-/-)	657 bp	无
杂合子 (+/-)	657 bp	817 bp
野生型 (+/+)	无	817 bp

3) DNA 提取方法

a. 裂解: 鼠尾加入 100 μ L 裂解缓冲液(含 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、0.1% Triton X-100、0.4 mg/mL 蛋白酶 K), 56 $^{\circ}$ C 过夜消化。

b. 灭活: 98 $^{\circ}$ C 加热 13 分钟灭活蛋白酶 K。

c. 离心: 最高速离心 15 分钟, 取上清直接用于 PCR。

4) PCR 反应体系与条件

a. 反应体系 (25 μ L)

表 2.9 PCR 反应体系

成分	
ddH ₂ O	9.0 μ l
引物 F	1.0 μ l
引物 R	1.0 μ l
Premix Taq	12.5 μ l
DNA	1.5 μ l
合计	25 μ l

b. 扩增程序

表 2.10 PCR 扩增程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 °C	3 min	1×
变性	94 °C	30 s	
退火	60 °C	35 s	35×
延伸	72 °C	35 s	
终延伸	72 °C	5 min	1×

2.3.2 外伤性脑损伤模型 (TBI) 建立

- 1.选择年龄为 8 周、体重在 20 至 25 克之间的成年小鼠作为实验对象。
- 2.在戊巴比妥钠(100 mg/kg) 的麻醉下，小鼠通过正中头皮切口暴露颅骨，置于解剖镜下。
- 3.使用电动微钻进行直径 4.0 毫米的颅骨切除术，去除部分颅骨，颅骨切除的坐标为前后方向 (AP) -1.0 至+2.0 毫米，左右方向 (ML) 0.5 至 3.5 毫米。因硬脑膜破裂导致过度出血的小鼠均被移出本研究。
- 4.颅骨切除后，使用配备有 3.0 毫米直径冲击头的 eCCI，冲击深度设定为距硬脑膜 1.25 毫米，预设速度为 4.0 m/s，持续 100 ms，损伤球的前肢运动皮层。
- 5.缝合头皮切口。

2.3.3 圆筒实验

1) 行为实验

- a. 在测试前让老鼠适应测试室至少 30 分钟，提供与测试相同的光照条件，让老鼠不受干扰地休息。
- b. 将老鼠放入玻璃圆柱体的中间并启动计时器，任动物在玻璃圆柱体内自由活动。
- c. 记录小鼠在玻璃圆柱体中 5 分钟的活动情况。
- d. 用 75%乙醇喷洒圆筒以去除任何气味痕迹，在下一次测试之前让玻璃圆筒干

燥。

e. 对所有测试的小鼠重复步骤。

2) 数据处理

a. 计算右爪、左爪或双爪的触壁次数，将数据表达为受损前肢相对于总接触的百分比 $[(\text{对侧触摸})/(\text{同侧触摸} + \text{对侧触摸}) \times 100]$ 。

2.3.4 旷场实验

1) 行为实验

a. 在测试前让老鼠适应测试室至少 30 分钟，提供与测试相同的光照条件，让老鼠不受干扰地休息。

b. 实验装置安装好后，将动物从饲养笼里取出，背向实验者放置到旷场的中央区域，实验者迅速离开，任动物在实验箱自由活动。

c. 记录小鼠在旷场箱体中 5 分钟的活动情况。

d. 用 75%乙醇喷洒旷场箱体以去除任何气味痕迹，在下一次测试之前让旷场箱体干燥。

e. 对所有测试的小鼠重复步骤。

2) 数据处理

a. 计算小鼠在旷场中不同区域所待的时间及平均速度、轨迹线、总运动距离等，反应小鼠的活动能力。

2.3.5 急性脑切片制备

1) 准备切片液和孵育液，切片液置于冰上，孵育液倒入孵育槽中 34 °C 水浴，两种溶液均用的混合气充氧 1 h，使溶液处于氧饱和状态。

2) 准备好两个烧杯和一个玻璃皿，将事先冰冻好的孵育液取出并用碎冰机打碎，分别放入三个容器中，并倒入约 20 mL 切片液，三个容器均置于冰上。

3) 将手术器械插入冰中预冷，将待实验小鼠灌流、断头，并将头部浸入一个烧杯中洗去血液，浸泡 5~10 s 后取出。

4) 沿中缝将头皮和头骨剪开，直到嗅球处，并用镊子将头骨向两侧掀开，露出完整的大脑结构。在解剖过程中注意不断将脑组织放入烧杯中，以保持脑组织低

温和湿润。

- 5) 挖出完整大脑，放入玻璃皿中保持低温，准备沿冠状面切片。
- 6) 在振动切片机上正确安装好刀片和切片槽，并在合适位置涂上水凝胶。
- 7) 镊子夹出脑组织，用吸水纸吸去底部液体，放于水凝胶处，并向切片槽中加入切片液直至没过脑组织。
- 8) 持续向切片槽中的切片液充氧以维持切片过程中的氧饱和状态。
- 9) 高频低速切片，切片厚度为 250 μm 。
- 10) 切片完成后，34 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。
- 11) 孵育结束后，将孵育槽取出，室温放置 10~15 min 以恢复细胞形态，随后可以开始进行实验。

2.3.6 电极制备

选取长度为 10 cm、外径为 1.5 mm、内径为 0.86 mm 的玻璃微电极。设置拉制仪参数，拉出合适电极（灌注电极内液后阻值为 4.5~5.5 $\text{M}\Omega$ ）。每次拉制间隔 5 min，电极拉好后放入电极盒内保存，以避免灰尘堵塞。

2.3.7 全细胞膜片钳记录

- 1) 打开膜片钳放大器、数模转换器、微操纵仪和 Q-capture 摄像机，并打开 Clampex10.7、MultiClamp700B 和 Q-capture 软件备用。
- 2) 将孵育好的脑片放置于显微镜下凹槽中，并用 U 型压片网压住，从而将脑片固定，并使待测区域处于合适位置。
- 3) 使用低倍镜头找到待测区域，移至视野中间，再切换到高倍镜，调整焦距至细胞清晰可见。
- 4) 将电极内液注入电极中，轻弹电极靠近尖端处以排出气泡。
- 5) 将 Clampex10.7 调整至 membrane test 模式，并使基线归零。
- 6) 给予电极内液一个正压，操作微操纵仪直至电极尖端靠近选定的细胞。
- 7) 调整电极尖端位置，直至电极尖端触碰到细胞膜；撤去正压并将电压钳调整至 -80 mV。
- 8) 给电极内液一个负压，使电阻达到 1 $\text{G}\Omega$ ，完成封接，撤去负压联通大气。

- 9) 在 Clampex10.7 的 patch 模式下, 重新给予电极内液负压至细胞膜破膜。
- 10) 运行程序并记录待测数据。

2.3.8 数据分析

实验所得数据在 clampfit10.7 中分析检测, 所得结果置于 Excel 中处理汇总, 之后利用 GraphPad Prism8.0 作图。

本实验均以 n 代表样本数目, 统计结果均以 mean ± S.E.M 的形式给出。数据采取 One-way NOVA、Paired Student' s t-Test 进行检验, $p < 0.05$ 表示有统计学差异。

三、研究结果

3.1 PCR 方法检验小鼠基因型

C57BL 小鼠对目标基因：*Kcnb1* (NCBI ID: 16500) 进行常规敲除后，为了鉴定 *Kcnb1* 突变体是否为纯合，取突变体鼠尾提取总 DNA，野生型作为对照，根据 2.3 中引物及扩增程序，使用 PCR 扩增验证。野生型 DNA 片段 817 bp，突变体 DNA 片段为 657 bp，琼脂糖凝胶结果如图 3.1 所示。本次实验中 1、2、7 号小鼠为 *Kcnb1* 杂合突变体，3-6 号小鼠为纯合突变体，可用于后续实验。

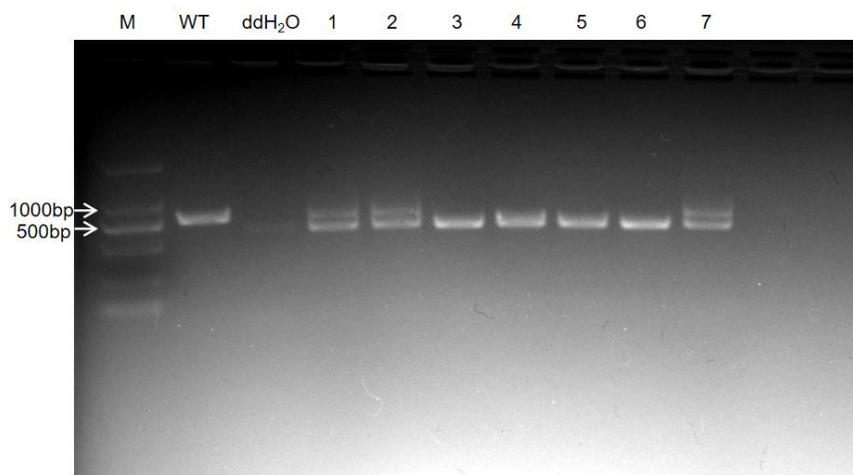


图 3.1 PCR 方法检验小鼠基因型

3.2 Kv2.1_KO 减慢小鼠 CC7 术后前肢使用不对称性恢复

为了建立用于治疗单侧创伤性脑损伤的 CC7 手术小鼠模型，我们用旷场实验筛选了活动能力及焦虑水平一致的小鼠，对野生型小鼠及 *Kv2.1* 全身性基因敲除小鼠进行相同处理，首先使用电皮质挫伤撞击器 (eCCI) 损伤成年小鼠的左半球大脑皮层 (前后 = +1.0 mm 至 -2.0 mm，内侧 = 0.5 mm 至 3.5 mm)，导致单侧脑损伤。两周后，在急性损伤期结束后进行左右颈七交叉移位术 (CC7 手术)。

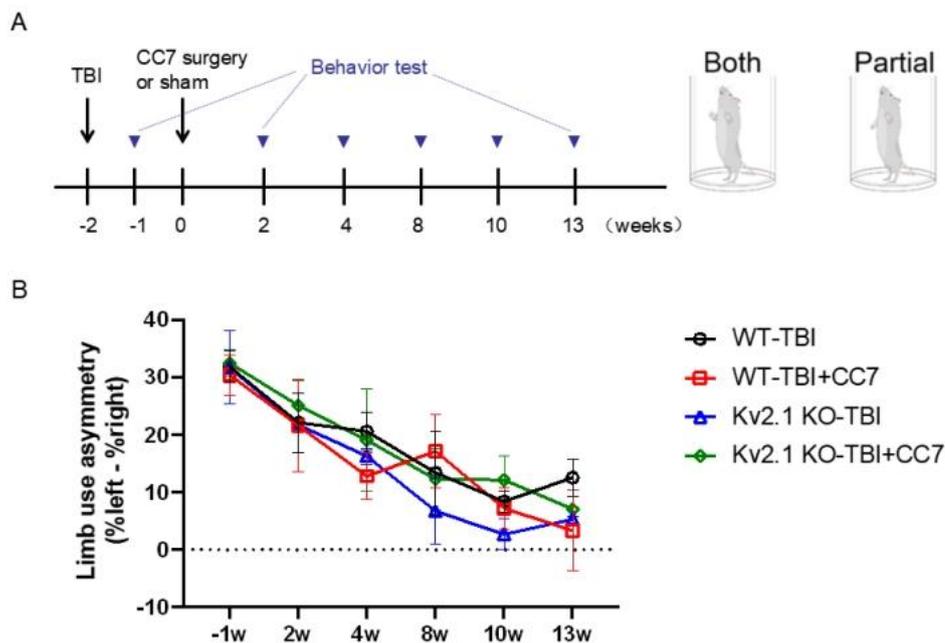


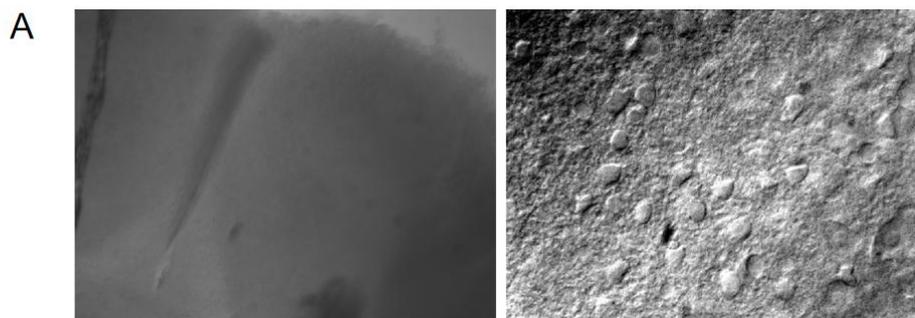
图 3.2 Kv2.1_KO 减慢小鼠 CC7 术后前肢使用不对称性恢复

(A)行为研究的时间线（左）和小鼠圆筒实验的示意图（右）^[14]；(B) 行为测试，使用圆筒测试（每组 n = 6），以评估小鼠受损前肢的功能

圆筒测试行为学评估方法，常用于脑卒中、帕金森病等单侧神经损伤模型中检测前肢使用不对称性。对于上述处理的小鼠，术后 13 周内，每隔两周进行一次圆筒行为测试，计算小鼠壁面接触动作左肢接触与右肢接触占总比的差值。数据显示，野生型小鼠在进行 CC7 术后，左肢接触与右肢接触占总比的差值降低，表明野生型小鼠在 CC7 术后前肢及运动功能恢复更快。而 Kv2.1 全身性基因敲除小鼠进行 CC7 术后，左肢接触与右肢接触占总比的差值反而较高，表明 Kv2.1 全身性基因敲除鼠的 CC7 手术使其前肢及运动功能恢复变慢。这提示了 Kv2.1 的敲除可能使 CC7 手术皮层重塑功能无法完成，Kv2.1 通道可能在左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中有其作用。

3.3 Kv2.1_KO 影响 CC7 术后微型兴奋性突触后电流 (mEPSC) 变化

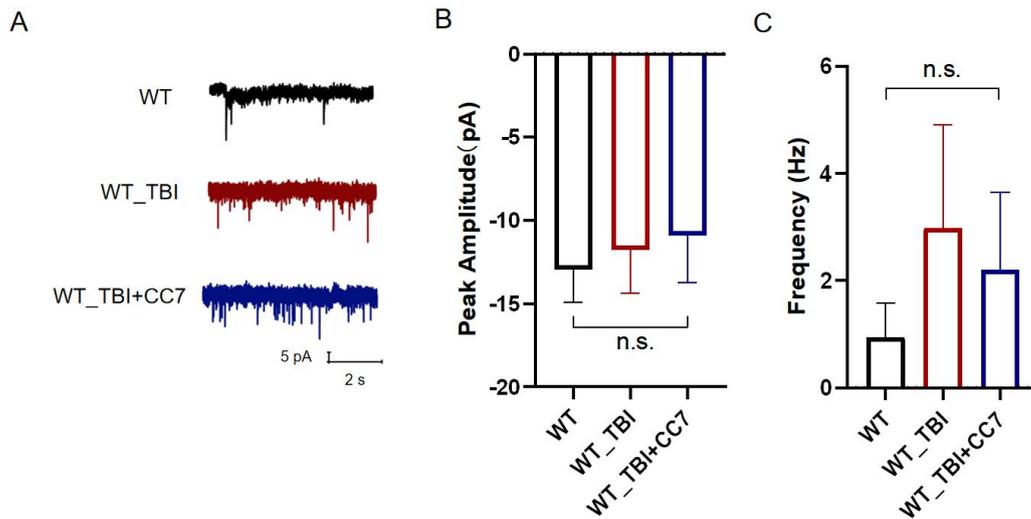
为了探究 Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中的具体作用,用上述造模及手术后小鼠制备急性脑切片,在大脑皮层 2/3 层区域使用膜片钳电生理方法,在全细胞记录模式下,记录小鼠的微型兴奋性突触后电流 (mEPSC)。在记录过程中,使用电压钳模式将细胞膜电位保持在-70 mV,并在细胞记录外液中加入 $1 \mu\text{M}$ TTX 抑制钠电流引发的自发动作电位。



3.3 大脑皮层神经元与兴奋性突触后电流 (mEPSC)

(A) 低倍镜下脑切片的显微成像 (左) 和高倍镜下大脑皮层神经元的显微成像 (右)

我们首先检测了野生型小鼠在脑损伤处理,及 CC7 术后的 mEPSC,计算其电流振幅峰值及频率,结果如图 3.4。野生型小鼠的 mEPSC 振幅峰值在脑损伤后有降低的趋势,且手术后仍然有降低趋势,但无显著性差异。提示小鼠的脑损伤降低了大脑皮层单突触信号传递效率,也可能与 AMPA 和 NMDA 受体数量降低、受体功能抑制、结构变化有关。而野生型小鼠的 mEPSC 频率在脑损伤后有升高趋势,在手术后有降低趋势,无显著性差异。这提示小鼠的脑损伤降低了大脑皮层中功能性突触形成的数量,可能与突触前 Ca^{2+} 信号的条件、突触囊泡调节或突触结构有关,这一异常可能通过 CC7 手术得到好转。

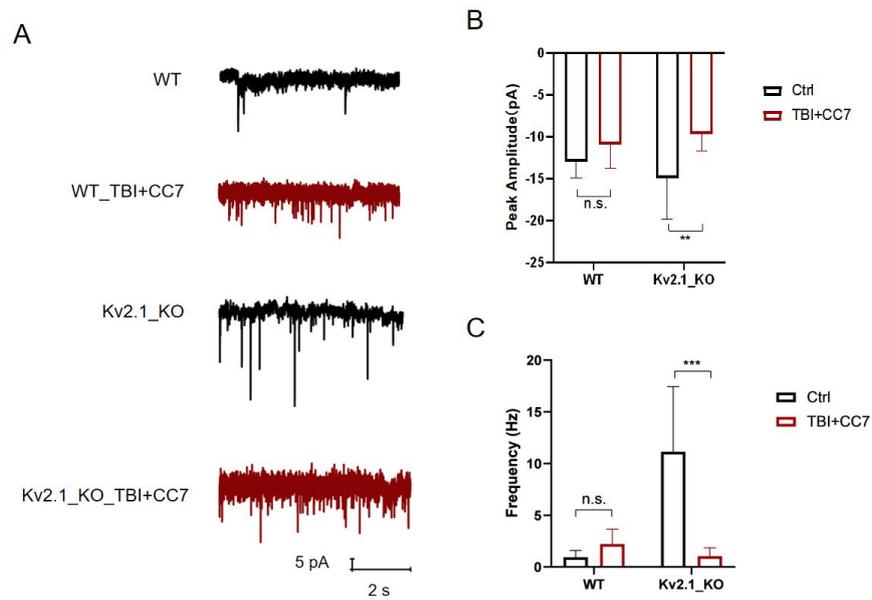


3.4 脑损伤及 CC7 术后 mEPSC 变化

(A) 微型兴奋性突触后电流 (mEPSC) 示意图; (B) 神经元 mEPSC 振幅峰值统计图 (n=6、7、11), 经 One-way ANOVA 检验, 无显著差异; (C) 神经元 mEPSC 频率统计图 (n=6、7、11), 经 One-way ANOVA 检验, 无显著差异

我们进一步检测野生型小鼠及 Kv2.1 全身性基因敲除鼠 mEPSC, 计算其电流振幅峰值及电位, 结果如图 3.5。野生型小鼠在 CC7 手术后 mEPSC 振幅峰值与对照小鼠无显著差异, 而 Kv2.1 全身性基因敲除鼠在 CC7 手术后 mEPSC 振幅峰值比对照小鼠显著降低。这一结果显示, 由小鼠脑损伤所带来的 mEPSC 振幅峰值降低可以通过 CC7 手术得到治疗, 但 Kv2.1 全身性基因敲除后该效果无法达成。据此分析, Kv2.1 通道可能在 CC7 术后大脑皮层单突触信号传递效率的恢复中有重要作用。

野生型小鼠在 CC7 手术后 mEPSC 频率与对照小鼠无显著差异, 而 Kv2.1 全身性基因敲除鼠在 CC7 手术后 mEPSC 频率比对照小鼠显著降低。这一结果显示, 小鼠脑损伤及 CC7 后使 mEPSC 频率升高, 但 Kv2.1 全身性基因敲除后并不会出现这一现象。据此分析, Kv2.1 通道在 CC7 术后大脑皮层功能性突触形成中有重要作用。



3.5 Kv2.1_KO 改变 CC7 术后 mEPSC

(A) 微型兴奋性突触后电流 (mEPSC) 示意图; (B) 神经元 mEPSC 振幅峰值统计图 (n = 6、5、11、10), 经过 Paired Student's t-Test 检验, n.s.表示没有显著性差异, **表示 $p < 0.01$; (C) 神经元 mEPSC 频率统计图 (n = 6、7、11、10), 经过 Paired Student's t-Test 检验, n.s.表示没有显著性差异, ***表示 $p < 0.001$

四、讨论

左右颈七交叉移位术（CC7 手术）连接对侧半球和瘫痪的手，在成人患者脑损伤后可以有效恢复熟练的前肢功能^[28]。CC7 手术引起的功能恢复不仅限于 C7 神经本身支配的功能，还可以用于治疗儿童脑瘫患者、实现中老年脑卒中患者的康复等^[15]。在脊髓损伤、受伤后脑可塑性恢复、唤醒成人脑内休眠可塑性等临床治疗领域也有很大的应用价值^[29,30]。过去研究表明，通过手术重建同侧感觉输入是 CC7 手术改善单侧皮质损伤成年小鼠受损前肢熟练运动的机制^[14]。

本研究中，我们以野生型及 Kv2.1 全身性基因敲除鼠为研究对象，采用动物行为学、脑片膜片钳的技术方法，使用 TBI 小鼠模型探讨 Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中的作用。研究发现，在小鼠 CC7 术后前肢使用不对称性恢复过程中，Kv2.1 全身性基因敲除小鼠与野生型不同，在术后前肢使用不对称性恢复更慢。且 Kv2.1 全身性基因敲除后小鼠皮层 mEPSC 结果显示，Kv2.1 通道可能在 CC7 术后大脑皮层单突触信号传递效率的恢复、大脑皮层功能性突触形成中有重要作用。

本课题的研究侧重于大脑皮层功能的重塑，而实验中观察发现 Kv2.1 通道全身性敲除小鼠活跃度与野生型小鼠相比明显提高，先前亦有研究发现 Kv2.1 通道在旷场和高架十字实验中表现出更高的探索欲望和更低水平的焦虑样行为^[31]。故而除了大脑皮层中的功能外，Kv2.1 通道是否会通过脊髓运动神经元、癫痫性运动等其他机制影响小鼠的术后运动恢复仍需进一步探究。我们也希望在后续进一步探究 Kv2.1 通道对于神经元内质网/质膜（ER/PM）的组织、相关胞体 Ca²⁺信号，特点基因表达的调控等，进一步探究 Kv2.1 通道在调控左右颈七交叉移位术后脑功能重塑中的具体机制。

参考文献

1. Feigin, V.L., M.H. Forouzanfar, R. Krishnamurthi, et al., *Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2014. **383**(9913): p. 245–54.
2. Langhorne, P., J. Bernhardt, and G. Kwakkel, *Stroke rehabilitation*. Lancet, 2011. **377**(9778): p. 1693–702.
3. Langhorne, P., F. Coupar, and A. Pollock, *Motor recovery after stroke: a systematic review*. Lancet Neurol, 2009. **8**(8): p. 741–54.
4. Lu, P., Y. Wang, L. Graham, et al., *Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1264–73.
5. Di Pino, G., G. Pellegrino, G. Assenza, et al., *Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(10): p. 597–608.
6. Joy, M.T., E. Ben Assayag, D. Shabashov-Stone, et al., *CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury*. Cell, 2019. **176**(5): p. 1143–1157.e13.
7. Kwakkel, G., J.M. Veerbeek, E.E. van Wegen, et al., *Constraint-induced movement therapy after stroke*. Lancet Neurol, 2015. **14**(2): p. 224–34.
8. Grafman, J. and A.M. Salazar, *The ebb and flow of traumatic brain injury research*. Handb Clin Neurol, 2015. **128**: p. 795–802.
9. Küpper, H., M. Kudernatsch, T. Pieper, et al., *Predicting hand function after hemidisconnection*. Brain, 2016. **139**(Pt 9): p. 2456–68.
10. Holloway, V., D.G. Gadian, F. Vargha-Khadem, et al., *The reorganization of sensorimotor function in children after hemispherectomy. A functional MRI and somatosensory evoked potential study*. Brain, 2000. **123 Pt 12**: p. 2432–44.
11. Cai, N.M., J.P.A. Dewald, and N. Gurari, *Individuals with hemiparetic stroke abnormally perceive their elbow torques when abducting their paretic shoulder*. Clin Neurophysiol, 2023. **156**: p. 38–46.
12. McPherson, J.G., A. Chen, M.D. Ellis, et al., *Progressive recruitment of contralesional cortico-reticulospinal pathways drives motor impairment post stroke*. J Physiol, 2018. **596**(7): p. 1211–1225.
13. Silva, C.C., A. Silva, A. Sousa, et al., *Co-activation of upper limb muscles during reaching in post-stroke subjects: an analysis of the contralesional and ipsilesional limbs*. J Electromyogr Kinesiol, 2014. **24**(5): p. 731–8.
14. Gao, Z., Z. Pang, G. Lei, et al., *Crossing nerve transfer drives sensory input-dependent plasticity for motor recovery after brain injury*. Sci Adv, 2022. **8**(35): p. eabn5899.
15. Gao, Z., G. Lei, Z. Pang, et al., *A Mouse Model of Direct Anastomosis via the Prespinal Route for Crossing Nerve Transfer Surgery*. J Vis Exp, 2021(176).

16. Liu, Y., X. Wang, W. Li, et al., *A Sensitized IGF1 Treatment Restores Corticospinal Axon-Dependent Functions*. *Neuron*, 2017. **95**(4): p. 817–833.e4.
17. Pischiutta, F., E. Micotti, J.R. Hay, et al., *Single severe traumatic brain injury produces progressive pathology with ongoing contralateral white matter damage one year after injury*. *Exp Neurol*, 2018. **300**: p. 167–178.
18. Starkey, M.L., A.W. Barritt, P.K. Yip, et al., *Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice*. *Exp Neurol*, 2005. **195**(2): p. 524–39.
19. Vierra, N.C., M. Kirmiz, D. van der List, et al., *Kv2.1 mediates spatial and functional coupling of L-type calcium channels and ryanodine receptors in mammalian neurons*. *Elife*, 2019. **8**.
20. Newkirk, G.S., D. Guan, N. Dembrow, et al., *Kv2.1 Potassium Channels Regulate Repetitive Burst Firing in Extratelencephalic Neocortical Pyramidal Neurons*. *Cereb Cortex*, 2022. **32**(5): p. 1055–1076.
21. Bishop, H.I., D. Guan, E. Bocksteins, et al., *Distinct Cell- and Layer-Specific Expression Patterns and Independent Regulation of Kv2 Channel Subtypes in Cortical Pyramidal Neurons*. *J Neurosci*, 2015. **35**(44): p. 14922–42.
22. Misonou, H., D.P. Mohapatra, and J.S. Trimmer, *Kv2.1: a voltage-gated k⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability*. *Neurotoxicology*, 2005. **26**(5): p. 743–52.
23. Ding, T., A.M. Magarinos, L.M. Kow, et al., *Kv2.1 expression in giant reticular neurons of the postnatal mouse brain*. *J Chem Neuroanat*, 2021. **117**: p. 102005.
24. Fox, P.D., C.J. Haberkorn, A.V. Weigel, et al., *Plasma membrane domains enriched in cortical endoplasmic reticulum function as membrane protein trafficking hubs*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(17): p. 2703–13.
25. Cobb, M.M., D.C. Austin, J.T. Sack, et al., *Cell Cycle-dependent Changes in Localization and Phosphorylation of the Plasma Membrane Kv2.1 K⁺ Channel Impact Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites in COS-1 Cells*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(49): p. 29189–201.
26. Fox, P.D., C.J. Haberkorn, E.J. Akin, et al., *Induction of stable ER-plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels*. *J Cell Sci*, 2015. **128**(11): p. 2096–105.
27. Wan, D., T. Lu, C. Li, et al., *Glucocorticoids Rapidly Modulate Ca(V)1.2-Mediated Calcium Signals through Kv2.1 Channel Clusters in Hippocampal Neurons*. *J Neurosci*, 2024. **44**(45).
28. Zheng, M.X., X.Y. Hua, J.T. Feng, et al., *Trial of Contralateral Seventh Cervical Nerve Transfer for Spastic Arm Paralysis*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(1): p. 22–34.
29. Ghosh, A., F. Haiss, E. Sydekum, et al., *Rewiring of hindlimb corticospinal neurons after spinal cord injury*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(1): p. 97–104.

30. Ganzer, P.D., S.C.t. Colachis, M.A. Schwemmer, et al., *Restoring the Sense of Touch Using a Sensorimotor Demultiplexing Neural Interface*. *Cell*, 2020. **181**(4): p. 763–773.e12.
31. Speca, D.J., G. Ogata, D. Mandikian, et al., *Deletion of the Kv2.1 delayed rectifier potassium channel leads to neuronal and behavioral hyperexcitability*. *Genes Brain Behav*, 2014. **13**(4): p. 394–408.

致谢

本课题的完成历经大半年，得益于许多人的指导和帮助，故在此一一感谢。

首先感谢我的导师胡长龙老师。胡老师在科研中严谨认真、学识渊博，善于言传身教。老师多次亲自指导我的实验、帮助我排查问题，一同思考数据，帮助我良多。从课题的立项到执行，胡老师不间断地关注课题的进展，给予我关键的指导和建议。在本文的撰写和修改过程中，胡老师也细致耐心地引领我精益求精。我很幸运能在胡老师门下修习。

同样地，我要感谢陆童创师兄，他在研究过程中给予我许多帮助。在文献阅读、实验操作、数据处理等过程中，都传授了我许多宝贵的经验。师兄为人认真细致，对我多有包容，也是我学习的榜样。感谢唐笙愉师姐在细胞培养方面对我的指导，感谢张雪峰师兄、王良娅师姐、蔡梦迪师兄、蔡永辉师兄，在进入课题组之前有诸多不顺的经历，是胡老师和师兄师姐们让我重拾了科研学习的信心。

感谢在复旦的四年学习经历，打开四年前的清单，还算一笔笔都勾上了。感谢一直支持我的母亲，感谢陪伴我的朋友们，习惯于从你们那里汲取能量的我，也希望之后也能给你们源源不断的能量，就这样左脚踩右脚，一起越飞越高。

吾生也有涯，而知也无涯。祝以后，万事胜意！