论著

文章编号:1000-5404(2006)19-1942-03

PTEN表达下调对神经元缺氧损伤的保护及其作用机制

陈力学[1],姜利人[2],刘宝松[2],龙在云[2],康格非[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院二病区实验室,重庆 400016;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨PTEN对NR2B磷酸化的调节作用及其在阻断Ca^{2+}内流和神经元保护中的作用。**方法** 建立神经元缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation,OGD)损伤模型,转染shRNAspten-GFP质粒,采用Fura 2-AM法测定胞内Ca^{2+}浓度,用免疫沉淀法和Western blotting检测NR2B及磷酸化水平。**结果** OGD后NR2B酪氨酸磷酸化水平和胞内Ca^{2+}浓度显著升高,shRNAspten-GFP能成功转染到神经元中,并可显著下调其酪氨酸磷酸化水平($F=11.82$, $P<0.05$),胞内Ca^{2+}浓度也显著低于损伤组和PshGFP阴性对照组($F=62.85$, $P<0.05$)。**结论** PTEN表达下调对缺氧诱导的NR2B酪氨酸磷酸化水平升高有拮抗作用,阻断Ca^{2+}内流,从而达到神经元保护作用。

关键词: PTEN;NR2B;shRNAs;酪氨酸磷酸化

中图法分类号: R338.1; R394.2; R741.02 **文献标识码**: A

Neuroprotective effect of PTEN down-regulation on neuron subjected to anoxic insult

CHEN Li-xue[1], JIANG Li-ren[2], LIU Bao-song[2], LONG Zai-yun[2], KANG Ge-fei[1] ([1]Lab of Second Ward, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Sciences Medical, Chongqing 400016; [2]State Key Laboratory of Burns, Trauma and Combined Injuries, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the regulation of PTEN on NR2B phosphorylation and the active roles in blocking Ca^{2+} influx and neuroprotection. **Methods** In the oxygen-glucose deprivation (OGD) model with anaerobic gas mixture and deoxygenated, glucose-free extracellular solution, shRNAspten-GFP and unrelated control plasmid PshGFP transfection were done respectively. Intracellular free calcium concentration were measured with Fura-2 AM fluorescent indicator, the expression of NMDA receptor subunits NR2B and its tyrosine phosphorylation were analyzed by immunoblotting and immunoprecipitation (IP). **Results** shRNAspten-GFP plasmid could been expressed successfully in cultured neurons. Tyrosine phosphorylation levels of NMDA receptor subunits NR2B after OGD decreased significantly after shRNApten treatment ($F=11.82$, $P<0.05$). Intracellular free calcium concentration with shRNAspten-GFP treatment after OGD was significantly lower than that in OGD group and PshGFP group ($F=62.85$, $P<0.05$). **Conclusion** PTEN down-regulation could effectively suppress the tyrosine phosphorylation of NR2B induced by OGD and the followed increase of intracellular free calcium concentration, and then protect neuron from anoxic injury.

Key words: PTEN; NR2B; shRNAs; phosphorylation

第10号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)是迄今为止发现的第一个具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因,参与了蛋白质和酯类底物酪氨酸、丝/苏氨酸磷酸化的调节过程,广泛分布于大脑皮质、小脑、海马及嗅球等部位[1]。NR2B是N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDARs或NR)的亚单位之一,其酪氨酸磷酸化在Ca^{2+}内流及其所致的缺氧损伤发生过程中扮演着重要角色。本研究拟探讨PTEN与NR2B的结合及PTEN下调对NR2B磷酸化和Ca^{2+}内流的影响,为临床治疗脑缺血损害药物的靶点设计提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 胚胎大鼠海马神经元培养

取孕龄18 d的SD胚胎大鼠[由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)20020003]8只,体质量

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目(2003-8107)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application by Chongqing Scientific Committee (2003-8107)

作者简介:陈力学(1973-),男,重庆市云阳县人,博士研究生,检验师,主要从事中枢神经系统继发性损害发生机制方面的研究。电话:(023)68757703

通讯作者:刘宝松,电话:(023)68757703, E-mail:bsliu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-10-20;修回日期:2006-03-10

(330 ± 40) g，分离海马神经元（活细胞计数应 > 70%），按每孔 10^6 个细胞于 35 mm 培养皿中和 12 孔培养板中培养。具体方法详见文献[2]。

1.2　shRNAspten-GFP（short hairpin RNAs）转染[3]

按照 Lipofectamine™ 2000（Invitrogen 公司）试剂说明优化转染条件。将构建好的质粒 shRNAspten-GFP 与 1 条阴性对照 shRNA（简称为 PshGFP）分别转染至培养神经元，质粒与 Lipofectamine 脂质体按 1∶2.5 的比例进行，转染 24 h 后进行其他实验，并在激光共聚焦显微镜下进行观察。

1.3　缺氧损伤（oxygen glucose deprivation，OGD）

从 CO_2 培养箱中取出培养板（皿），吸去培养基，添加预先去氧的无糖细胞外液（ECS-OGD）。具体方法详见文献[2]。

1.4　实验分组

共分 4 组，正常对照组：正常培养细胞，不做任何处理；损伤组（OGD）：进行缺氧损伤；PshGFP 阴性对照组：缺氧损伤并加入 PshGFP 质粒进行转染；shRNAspten（分再灌 24、48、72 h）治疗组：加入 shRNAspten-GFP 质粒并转染。每组各取培养板 2 板，重复 5 次。

1.5　检测指标

1.5.1　胞内 Ca^{2+} 浓度检测　伤后相应时间点取出培养板，D-Hanks 液洗涤，加不含小牛血清的 D-Hanks 液 2 ml，预温至 37 ℃，加 10 μl Fura 2-AM（1 mmol/L），孵育 30 min，D-Hanks 洗涤 3 次，加 NB 培养基 37 ℃孵育 30 min，0.25% 胰酶消化，收集细胞，Synergy HT 型（美国 Bio-TEK 公司）分光光度计测定钙离子荧光强度。根据下列公式计算细胞内游离钙的浓度：$[Ca^{2+}]i = K_d \times (F - F_{min})/(F_{max} - F)$；其中 K_d = 224 nmol/L，F_{min} 为加入 EGTA（至终浓度 8 μmol/L）时 340 nm 的荧光强度值；F_{max} 为加入 0.2% Triton 时 340 nm 荧光强度值。荧光分光光度计发射波长为 510 nm，激发波长为 340 nm，发射狭缝为 5 nm，激发光栅 10 nm，结果以 nmol/L 计。

1.5.2　NR2B 含量测定　收集细胞，PBS 洗涤，加少量裂解液[主要成分（mmol/L）：50 MOPS，0.2 DTT，0.5 Na_3VO_4，0.1 EDTA，1 EGTA，50 μg/ml 胃蛋白酶]，冰浴研磨，800 × *g* 4 ℃离心 5 min，取上清液，12 000 × *g* 4 ℃离心 15 min，弃上清，沉淀即为膜蛋白，定量后置于 −70 ℃冰箱待用。参考文献[4]的方法（略有改动），等量的样品蛋白（40 μg/孔）经 7.5% SDS-PAGE 分离后，转膜，加入用封闭液稀释的一抗（磷酸酪氨酸单抗或 NR2B 单抗），洗涤，加入二抗，洗涤，用 ECL 发光试剂（Santa Cruz 公司）。所得胶片扫描后用图像软件处理。

1.5.3　NR2B 酪氨酸磷酸化水平　采用免疫沉淀法进行[5]，取膜蛋白 200 μg，加入 SDS 和二硫代苏糖醇（DTT）至终浓度分别为 0.5% 和 1 mmol/L，煮沸 5 min 后，用 buffer B[主要成分（mmol/L）：20 MOPs pH 7.4，150 NaCl，1% TritonX-100，0.5% NP-40，1 EDTA，1 EGTA，0.2 Na_3VO_4，0.2 PMSF]稀释 4 倍。加入酪氨酸磷酸单抗（或 NR2B 单抗）2.5 μg，4 ℃轻轻摇动 4 h，加入 Protein A/G plus-Agarose 继续摇动 4 h，离心，收集磷酸化（或 NR2B）膜蛋白沉淀，SDS-PAGE 电泳分离后，加入 NR2B（或酪氨酸磷酸）一抗、二抗和 ECL 发光剂检测。

1.5.4　PTEN 含量测定　一抗为 PTEN 单抗，并加入相应的二抗，其余方法同 1.5.2。

1.6　统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　神经元的转染

在激光共聚焦显微镜下可见 PshGFP 阴性对照组和 shRNAspten-GFP 治疗组均有绿色荧光，转染效率约为 15%（图 1），说明 shRNApten 质粒已成功转染到神经元中。

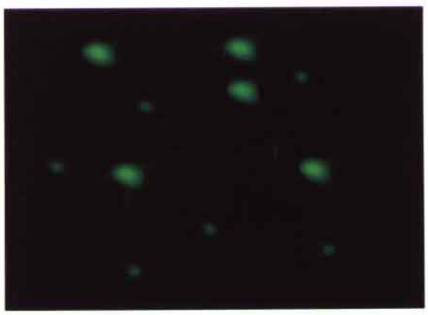
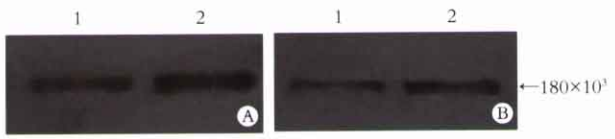


图 1　神经元转染 shRNAspten-GFP 48 h 后激光共聚焦显微镜观察（×200）

2.2　NR2B 酪氨酸磷酸化

联合应用免疫沉淀（IP）和 Western blotting 方法，验证分子量为 180×10^3 酪氨酸磷酸化蛋白与 NR2B 的关系。当用 Anti-p-Tyr 抗体做 IP 时，用 Anti-NR2B 进行 Western blotting（图 2A）；反之用 Anti-NR2B 抗体做 IP 时就用 Anti-p-Tyr 进行 Western blotting（图 2B）；结果显示，2 种方法（图 2A、2B）均可得到 1 条分子量为 180×10^3 的带，该结果与单独用 Anti-p-Tyr 进行 Western blotting 得到的结果一致。表明分子量为 180×10^3 的酪氨酸磷酸化蛋白是 NR2B，NR2B 的酪氨酸残基被磷酸化。



A：IP：Anti-p-Tyr，Western blotting：Anti-NR2B；
B：IP：Anti-NR2B，Western blotting：Anti-p-Tyr
1：shRNApten 治疗组；2：PshGFP 阴性对照组

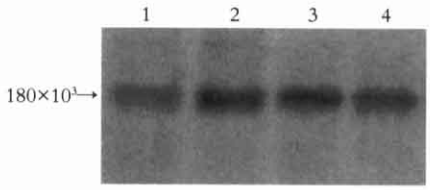
图 2　NR2B 的酪氨酸磷酸化 Western blotting 检测结果

2.3　shRNAspten 对 NR2B 酪氨酸磷酸化的影响

缺氧 1 h，再灌 24 h 后，PshGFP 阴性对照组与 OGD 组在分子量为 180×10^3 处的条带灰度面积近似（图 3），两组间 NR2B 磷酸化水平差异不显著（$P > 0.05$）；但与正常组相比，则显著增加（$P < 0.05$），约为正常组的 2 倍。shRNAspten 治疗组 NR2B 磷酸化水平即分子量为 180×10^3 处条带灰度面积显著低于 PshGFP 无关对照组与 OGD 组（$P < 0.05$），下降幅度达 35%；各治疗组之间无显著差异（$P > 0.05$），表明 shRNAspten 可以下调 NR2B 蛋白磷酸化。

2.4　shRNAspten 对细胞内 PTEN 含量的影响

shRNAspten 治疗组细胞内 PTEN 含量显著低于正常组（$P < 0.05$），而 PshGFP 阴性对照组与对照组相比无明显差异（$P > 0.05$）。

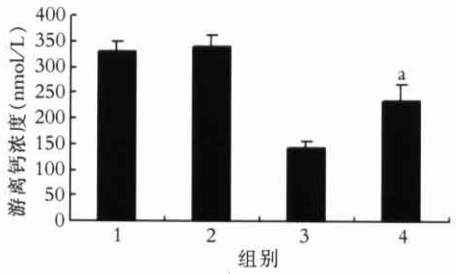


1：正常对照组；2：OGD 组；3：PshGFP 阴性对照组；4：shRNApten 治疗组

图3 缺氧 1 h 各组 NR2B 磷酸化水平 Western blotting 检测结果

2.5 shRNAspten 对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

PshGFP 阴性对照组与伤后 24 h 损伤组（OGD）细胞内 Ca^{2+} 浓度没有差异（$P>0.05$）；但其 Ca^{2+} 浓度显著高于正常组（$P<0.05$），约为正常组的 2.5 倍。与 PshGFP 阴性对照组和 OGD 组相比，PTEN 治疗组胞内 Ca^{2+} 浓度显著降低（$P<0.05$），降幅达 30% 左右，但各治疗组之间无显著差异（$P>0.05$）（图 4）。提示缺氧损伤后胞内 Ca^{2+} 明显增加，经 shRNAspten 治疗后细胞内 Ca^{2+} 浓度下降。



1：PshGFP 阴性对照组；2：损伤组；3：正常对照组；4：shRNApten 治疗组

a：$P<0.05$，与 PshGFP 阴性对照组比较

图4 海马神经元细胞质游离钙浓度变化

3 讨论

谷氨酸的兴奋性毒性作用是引起脑缺血损伤后继发性损害的重要原因之一。谷氨酸受体分离子型受体和代谢型受体两大类，前者又可分为 NMDA 受体、α-氨基羟甲基异恶唑丙酸（AMPA）受体和海藻氨酸（KA）受体 3 个亚类。NMDA 受体具有对 Ca^{2+} 的高通透性的特点，它有磷酸化和通道阻断剂等结合位点。缺血损伤后 NMDA 受体激活可介导 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 超载，引发一系列病理变化过程，导致细胞损伤和凋亡[5]。本研究结果显示，神经元发生缺氧损伤后胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组，其原因可能与 NMDA 受体的活性增加密切相关。

NMDA 受体分 NR1 和 NR2 两个亚型，后者又含 4 个亚单位，其中 NR2B 是在 NMDA 受体功能中起重要作用。研究表明，非选择性的 NMDA 受体阻断剂有很大的副作用，而 NR2B 亚型阻断剂可发挥相似功能，但副作用较小。因此，NR2B 的功能调节成为神经损伤保护研究的热点问题之一[6]。近年研究表明，大鼠前脑缺血后可通过细胞周期依赖性激酶-5（Cdk5）催化 NR2 受体磷酸化，从而促进 NMDA 受体活性和 Ca^{2+} 内流；干扰 Cdk5 和 NR2 的相互作用而阻断磷酸化，则可有效保护海马 CA1 区神经元的兴奋性神经毒性损伤[4]。本研究结果表明，缺氧损伤后细胞膜表面 NR2B 磷酸化水平显著增高，并进一步引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加。该结果提示 NR2B 酪氨酸磷酸化水平与 NMDA 受体活性和 Ca^{2+} 内流密切相关。

PTEN 是迄今发现的重要抑癌基因，参与了蛋白质和酯类底物酪氨酸、丝/苏氨酸磷酸化的调节过程，它可通过抑制 PI3K/Akt 信号途径，上调细胞生长周期的关键激酶抑制因子 $P27^{kipl}$，干扰细胞生长信号，使细胞阻滞于 G_1 期，增加细胞对凋亡的敏感性。PTEN 也作用于局部附着激酶（FAK）阻碍肿瘤细胞转移、扩散，抑制血管生成[7]。本研究尚无确切证据证实 PTEN 与 NR2B 相互连接构成复合物，但研究结果表明，下调 PTEN 表达确可降低 NR2B 的磷酸水平，从而达到保护神经元的作用，该结果对临床治疗脑缺血损害药物的靶点设计有参考价值。

至于 PTEN 影响 NR2B 磷酸化水平的分子机制目前尚不清楚，本研究初步观察到 PTEN 可能与 NR2B 构成复合物，但尚无确切依据。文献[8]报道 PTEN 参与了突触后致密体与膜表面 NMDA 受体的结合，进而影响 NMDA 受体的功能；也有可能 PTEN 通过 Cdk5 而影响 NR2B 的磷酸化水平，但均有待于深入研究。

参考文献：

[1] CHOI J S, PARK H J, KIM H Y, *et al*. Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia[J]. Cell Tissue Res, 2005, 319(3): 359-366.

[2] 刘宝松，陈恒胜，许 忠，等. 缺氧所致神经元 AMPA 受体的结构组成及功能变化[J]. 第三军医大学学报，2004，26(23)：2139-2142.

[3] NING K, PEI L, LIAO M, *et al*. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN[J]. J Neurosci, 2004, 24(16): 4052-4060.

[4] WANG J, LIU S, FU Y, *et al*. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors[J]. Nat Neurosci, 2003, 6(10): 1039-1047.

[5] 李 勇，裴 林，张光毅. 脑缺血/再灌对蒙古沙土鼠海马突触体酪氨酸磷酸化的影响[J]. 生理学报，2000，52(2)：137-142.

[6] KEMP J A, MCKERNAN R M. NMDA receptor pathways as drug targets[J]. Nat Neurosci, 2002, 5(Suppl): 1039-1042.

[7] YAMADA K M, ARAKI M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 13): 2375-2382.

[8] VALIENTE M, ANDRES-PONS A, GOMAR B, *et al*. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases[J]. J Biol Chem, 2005, 280(32): 28936-28943.

（编辑 薛国文）