文章编号:1000-5404(2010)11-1169-04

论著

PTEN、Akt与CREB基因在偏头痛大鼠三叉神经节的表达

桂 蓓[1],张 聪[2],申崇标[1],陈力学[1],秦光成[1],周冀英[1],谭 戈[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院实验研究中心,重庆市神经病学重点实验室[1];400038 重庆,第三军医大学实验动物中心[2])

[摘要] **目的** 检测第10号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)与cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)基因在偏头痛模型大鼠三叉神经节的表达情况,探讨其在偏头痛发病机制中的相互关系及作用。**方法** 通过硝酸甘油(glyceryl trinitrate,GTN)法建立大鼠偏头痛模型,分别在GTN注射后1、4、12和24 h,取三叉神经节通过RT-PCR和免疫组化法对PTEN、Akt和CREB基因在mRNA和蛋白水平进行检测。**结果** PTEN的基因与蛋白表达开始呈下降趋势,至GTN 12 h时分别为(0.42±0.07)(0.19±0.02),较对照组(1.00±0.07)(0.36±0.02)有显著降低($P<0.05$),但到24 h时基因与蛋白表达量分别为(3.09±0.21)(0.45±0.05),又明显回升($P<0.05$);Akt与PTEN呈相反变化趋势,基因与蛋白表达在GTN 4 h(1.38±0.07)(0.23±0.03)和12 h(1.42±0.03)(0.25±0.02)时显著增加($P<0.05$),24 h(0.88±0.15)(0.15±0.06)表达又降至正常水平($P>0.05$);而GTN各组的CREB的基因与蛋白表达均较对照组(1.00±0.07)(0.43±0.03)有显著降低($P<0.05$),24 h(0.42±0.14)(0.27±0.05)表达量降到最低($P<0.05$)。PTEN与Akt、CREB的基因表达呈显著负相关,r分别为−0.671, −0.484($P<0.05$),蛋白表达也呈显著负相关,r分别为−0.563, −0.430($P<0.05$),而Akt与CREB的基因及蛋白表达相关性不显著,r分别为0.272, −0.041($P>0.05$)。**结论** 偏头痛大鼠三叉神经节中PTEN、Akt及CREB在GTN不同时间点表达发生改变,且PTEN调控了Akt与CREB的表达,可能通过影响神经突触可塑性,参与偏头痛的发生发展过程。

[关键词] PTEN;Akt;CREB;偏头痛;三叉神经节
[中图法分类号] R747.202; R322.81; R394.3 **[文献标志码]** A

Expression of phosphatase and tensin, serine-threonine kinase, and cAMP response element-binging protein in trigeminal ganglia of rats with migraine

Gui Bei[1], Zhang Cong[2], Shen Chongbiao[1], Chen Lixue[1], Qin Guangcheng[1], Zhou Jiying[1], Tan Ge[1] ([1]Experimental Research Center, Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Centre of Laboratory Animals, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of phosphatase and tensin (PTEN), serine-threonine kinase (Akt) and cAMP response element-binding protein (CREB) in trigeminal ganglia of rats with migraine and to study its role in pathogenesis of migraine. **Methods** A rat model of migraine was established using glyceryl trinitrate (GTN). Expression of PTEN, Akt, and CREB at mRNA and protein levels in trigeminal ganglia was detected by RT-PCR and immunohistochemistry 1, 4, 12 and 24 h respectively, after the model was established. **Results** The expression level of PTEN was 0.42±0.07 and 0.19±0.02 respectively at 12 h ($P<0.05$), and was 3.09±0.21 and 0.45±0.05 at 24 h in experimental group, which was higher than that (1.00±0.07 and 0.36±0.02) in control group ($P<0.05$). The expression level of Akt was 1.38±0.07 and 0.23±0.03, 1.42±0.03 and 0.25±0.02 at 4 and 12 h, and was 0.88±0.15 and 0.15±0.063 at 24 h in experimental group, which was lower than that (1.00±0.07 and 0.43±0.03) in control group ($P<0.05$). The expression level of CREB was significantly lower in experimental group than in control group ($P<0.05$), and was 0.42±0.14 and 0.27±0.05 (the lowest) at 24 h ($P<0.05$). The expression of PTEN was negatively correlated to Akt ($r=-0.671$ and -0.563) and CREB ($r=-0.484$ and -0.430 or $r=0.272$ and -0.041) ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of PTEN, Akt and CREB in trigeminal ganglia of rats with migraine is changed at different time points. PTEN regulates the expression of Akt and CREB, thereby

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5287);重庆医科大学附一院医学科学基金(YXJJ2009-15)
[通信作者] 陈力学,电话:(023)89012105,E-mail:chenlixue@163.com

affecting synaptic plasticity, and is thus involved in pathogenesis of migraine.

[Key words] phosphatase and tensin; serine-threonine kinase; cAMP response element-binding protein; migraine; trigeminal ganglion

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5287) and the Medical Research Foundation Project of The Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (YXJJ2009-15). Corresponding author: Chen Lixue, Tel: 86-23-89012105, E-mail: chenlixue@163.com

偏头痛是一种临床常见的头痛类型,发病率高,因其发病机制尚不明确,目前其药物治疗效果仍然不甚理想,近年来的研究表明三叉神经节的激活在偏头痛的发作过程中起到重要作用[1]。第10号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是目前发现的第一个具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因,在脑组织中高度表达,与癫痫、脑缺血、巨头、运动失调和脑干异常等神经系统重要的病理生理过程有关[2,3],近期研究发现PTEN也参与了神经源性疼痛的过程[4]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)是PTEN负性调控的下游关键信号因子,在神经元存活、轴突生长及突触可塑性方面发挥重要作用[5],并调节cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)。CREB是细胞内重要的核转录因子,参与了多种信号通路的调节,除调节神经元兴奋性、发育和长时程突触可塑性等功能外,在神经损伤的可塑性及神经源性疼痛中也有重要作用[6]。

本研究采用皮下注射硝酸甘油(glyceryl trinitrate, GTN)法建立大鼠偏头痛模型,应用RT-PCR和免疫组化技术,分别从基因和蛋白水平观察PTEN、Akt及CREB在偏头痛大鼠三叉神经节表达量的变化及相关性,以探讨这3个基因在偏头痛发病机制中的相互关系及作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Trizol RNA提取试剂盒购自Invitrogen公司,ReverTra Ace-α-第1链合成试剂盒购自TOYOBO公司,2×PCR Taq Mix购自北京天根生物公司,PCR引物采用软件Primer Premier 5.0设计,由上海生物工程有限公司合成。兔抗大鼠PTEN、AKt、CREB抗体购自美国abcam公司,生物素化的羊抗兔IgG,S-P免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒均购于北京中杉金桥;主要仪器有美国Bio-Rad公司的PCR仪,德国Leica公司的切片机等。

1.2 大鼠偏头痛模型的建立

清洁级健康成年雄性SD大鼠100只,体质量(250±20)g(重庆医科大学实验动物中心提供)。实验分为RT-PCR和免疫组化两部分,每部分按完全随机化原则分入下列各组(n=10),GTN 1、4、12、24 h组和生理盐水对照组。根据文献[7]方法,除对照组外,向SD大鼠皮下注射硝酸甘油(GTN)注射剂10 mg/kg,建立实验性偏头痛动物模型,对照组大鼠皮下注射等体积生理盐水。平均给药5 min后,观察动物行为学的变化,并用RT-PCR法检测偏头痛标志物CGRP表达量的变化,鉴定偏头痛模型。

1.3 半定量RT-PCR检测mRNA表达

取三叉神经节迅速放液氮中冻实,留做RNA提取备用。用Trizol法抽提总RNA,用分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量。根据TOYOBO逆转录试剂盒说明,将1 μg总RNA逆转录为cDNA,4℃冰箱保存备用。PCR反应体系25 μl,包含2×PCR *Taq* Mix 12.5 μl,10 μmol/L下游引物各0.5 μl,cDNA模板1 μl,补灭菌ddH_2O至25 μl;PCR反应条件:94℃预变性3 min,94 ℃变性20 s,58 ℃或60℃退火20 s,72 ℃延伸30 s,扩增35个循环,最后72 ℃延伸5 min。将PCR产物在1%的琼脂糖凝胶中进行电泳,置于凝胶图像分析系统进行吸光度扫描,以管家基因GAPDH作为内参照校正,用目的基因与GAPDH的比值代表目的基因相对表达含量。

1.4 免疫组化染色及图像分析

各组动物分别在相应时间点用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,经左心室插管至升主动脉,首先PBS灌注至清澈,再用4%多聚甲醛灌注250 ml,取脑三叉神经节组织后4%多聚甲醛后固定。常规脱水、石蜡包埋。石蜡切片机切片,片厚4 μm。切片经脱蜡水化后,用枸橼酸盐修复抗原。按S-P免疫组化染色试剂盒说明进行免疫组化染色,一抗兔抗大鼠PTEN、Akt、CREB抗体工作浓度为1∶100,阴性对照用PBS代替一抗,DAB显色。蒸馏水充分洗涤,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜200倍视野下观察拍摄。应用Image Pro Plus 6.0图像分析系统对切片阳性区域表达部分进行平均光密度值测定。

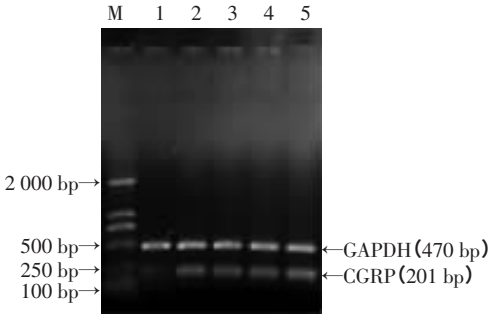
1.5 统计学分析

所得计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析,并进行多重比较,三个基因间的相互关系采用Pearson相关分析。

2 结果

2.1 偏头痛模型的鉴定

硝酸甘油注射5~10 min后,动物出现前肢频繁搔头,甩头,双耳发红等不适症状,对照组大鼠仅在15 min内略有挠头现象,之后趋于正常,且未出现搔头、甩头、双耳发红等现象。RT-PCR结果显示各模型组大鼠CGRP的表达量均显著高于假手术组($P<0.05$,图1),以上结果显示偏头痛模型成功建立。



M:标准; 1:对照组;2:1 h组;3:4 h组;4:12 h组;5:24 h组

图1 RT-PCR法检偏头痛大鼠三叉神经节CGRP mRNA电泳结果

2.2 GTN 不同时间点 PTEN、Akt、CREB 基因 mRNA 表达分析

经统计学分析表明(图 2,表 1),GTN 后 1 h 大鼠三叉神经节即可见 PTEN mRNA 表达量下降,但无统计学差异($P>0.05$),随时间的延长呈下降趋势,12 h 的 mRNA 表达量显著降低($P<0.05$),但 24 h 时又有显著升高($P<0.05$)。Akt mRNA 在 GTN 1 h 变化无显著差异($P>0.05$),4 h 和 12 h 表达量显著增加($P<0.05$),24 h 表达量又降至接近正常水平($P>0.05$)。CREB mRNA GTN 各组表达量均较正常对照组有显著降低($P<0.05$),24 h 降至最低点($P<0.05$)。Pearson 相关分析显示,PTEN 与 Akt mRNA 表达呈显著负相关($r=-0.671$, $P<0.05$),与 CREB mRNA 表达也呈显著负相关($r=-0.484$, $P<0.05$),而 Akt 与 CREB mRNA 表达无显著相关性($r=0.272$, $P>0.05$)。

2.3 免疫组化法检测 GTN 不同时间点 PTEN、Akt、CREB 基因蛋白表达分析

PTEN、Akt 阳性染色呈黄色至棕黄色,主要定位于细胞质,CREB 免疫阳性产物分布于神经元细胞质和胞核,阳性细胞呈棕黄色(图 3)。对照组 PTEN、Akt、CREB 有明显表达,GTN 1 h 后 PTEN 蛋白表达量开始下降,GTN 12 h 组蛋白表达量达到最低($P<0.05$),而后 24 h 表达量又显著升高($P>0.05$)。Akt 蛋白 1、4、8、12 h 各组的表达量逐渐升高,至 GTN 24 h 后又降至正常水平($P>0.05$)。CREB 蛋白 GTN 各组表达量均较正常对照组有显著降低($P<0.05$),24 h 时表达量降到最低($P<0.05$)(表 3)。Pearson 相关分析显示,PTEN 与 Akt 蛋白表达呈显著负相关($r=-0.563$, $P<0.05$),与 CREB 蛋白表达也呈显著负相关($r=-0.430$, $P<0.05$),Akt 与 CREB 蛋白表达无显著相关性($r=-0.041$, $P>0.05$)(表 2)。

表 1　偏头痛大鼠三叉神经节 PTEN、Akt 和 CREB 的 mRNA 相对表达($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

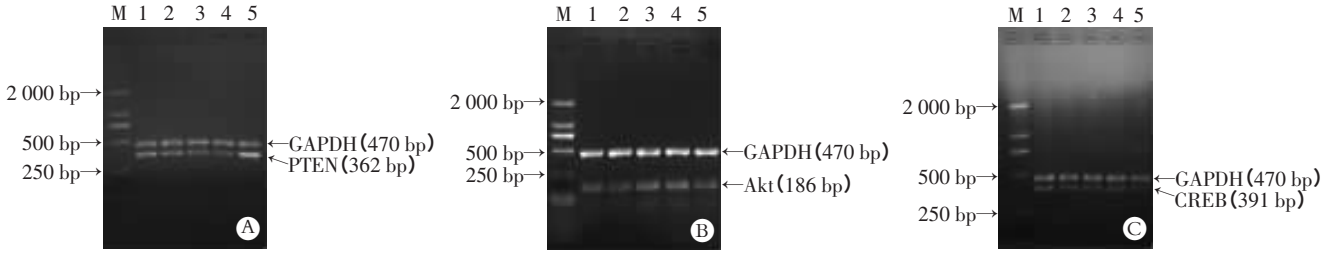
组别	PTEN	Akt	CREB
对照组	1.00±0.08	1.00±0.11	1.00±0.07
GTN 1 h	0.92±0.13	1.13±0.14	0.58±0.05[a]
GTN 4 h	0.86±0.11[a]	1.38±0.07[a]	0.62±0.04[a]
GTN 12 h	0.42±0.07[a]	1.42±0.13[a]	0.74±0.09[a]
GTN 24 h	3.09±0.21[a]	0.88±0.15	0.42±0.14[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较

表 2　偏头痛大鼠三叉神经节 PTEN、Akt 和 CREB 免疫组化染色平均光密度值($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

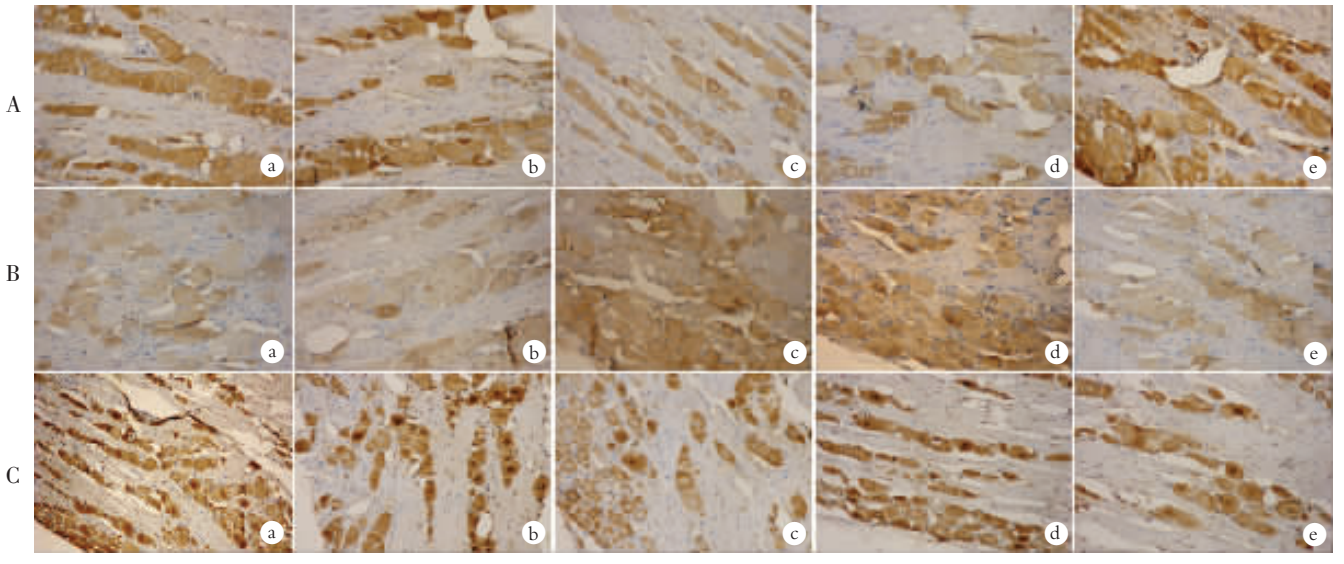
组别	PTEN	Akt	CREB
对照组	0.36±0.02	0.11±0.02	0.43±0.03
GTN 1 h	0.30±0.03	0.14±0.04	0.31±0.05[a]
GTN 4 h	0.28±0.07[a]	0.23±0.03[a]	0.35±0.03[a]
GTN 12 h	0.19±0.02[a]	0.25±0.02[a]	0.37±0.04[a]
GTN 24 h	0.45±0.05[a]	0.15±0.06	0.27±0.05[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较



A:PTEN mRNA;B:Akt mRNA;C:CREB mRNA;M: 标准; 1: 对照组; 2: 1 h 组; 3: 4 h 组; 4: 12 h 组; 5: 24 h 组

图 2　偏头痛大鼠三叉神经节 PTEN、Akt 和 CREB mRNA 的表达情况



A: PTEN;B: Akt;C: CREB; a:正常组;b:1 h 组;c:4 h 组;d:12 h 组;e:24 h 组

图 3　免疫组化检测偏头痛大鼠三叉神经节 PTEN、Akt 和 CREB 蛋白的表达　(S-P ×200)

3 讨论

偏头痛的发病机制十分复杂,现仍尚无定论,目前已发现当外界刺激由三叉神经节传入时,引起的血管活性物质CGRP的释放和神经突触可塑性改变是导致偏头痛的重要因素[8]。其中CGRP在偏头痛发病中的重要作用已得到临床和实验研究结果的支持,现常作为偏头痛的神经标志物。GTN模型在作用机制、行为症状表现与实验室指标变化同人类偏头痛时的表现及变化极为相似,是目前常用的偏头痛模型。我们用GTN皮下注射SD大鼠,通过行为学观察和CGRP表达量检测,发现大鼠行为出现异常(前肢频繁搔头,甩头,双耳发红等),且在GTN注射后24 h内CGRP的表达量都有显著升高,表明GTN模型成功建立。

PTEN在中枢神经系统中的作用正受到重视,近年来的研究发现PTEN在大脑皮质、小脑、海马及嗅球等部位也高度表达,广泛参与了神经细胞增殖、迁移、分化、凋亡和突触建立的调控,越来越多的证据表明PTEN在神经系统及其相关疾病的发生、发展中具有重要作用[9]。本研究发现:PTEN在大鼠的三叉神经节中也有显著表达,PTEN在偏头痛起始阶段表达明显降低,在GTN 24 h后其mRNA与蛋白表达水平有显著上升。推测可能因开始时高浓度的GTN产生应激反应PTEN表达下降,至24 h GTN代谢后,PTEN基因又有所上扬,上述结果表明PTEN基因参与了偏头痛的发生发展过程。

Akt途径是PTEN调节下游细胞信号转导的重要信号系统,在细胞的增殖、分化和凋亡过程中起到重要作用[3],最新研究表明Akt也参与了炎性痛、痛觉过敏以及神经病理性疼痛的过程[10-12]。本研究结果显示偏头痛时Akt的表达在4 h和12 h明显升高,至24 h时显著降低,变化趋势与PTEN呈显著负相关,这些结果提示在偏头痛过程中,PTEN负性调节Akt途径。

近年来已有多项研究表明Akt可使CREB在Ser133位点上被磷酸化,从而激活CREB,也有部分研究显示Akt可抑制CREB的活性[13,14]。CREB可以调节神经突触的相关功能蛋白,在长时程增强(long-term potentiation, LTP)的诱导和维持中起着正性调节作用,进而影响神经突触可塑性,而LTP和突触可塑性目前认为与偏头痛过程中的痛觉感受传递和中枢致敏密切相关[15,16]。本研究结果显示在偏头痛大鼠三叉神经节中CREB表达显著低于正常水平,且与PTEN呈负相关,与Akt无显著相关性,表明PTEN可能通过调控下游因子CREB,调节突触可塑性参与了偏头痛的过程,但CREB与偏头痛及其突触可塑性的关系研究才刚起步,具体时间点以及如何调控还有待进一步的探讨。PTEN与Akt、CREB是否还存在着如FAK、MAPK等其他信号途径的调控[17],还需进一步的深入研究。

本研究显示在偏头痛大鼠三叉神经节中PTEN、Akt及CREB在GTN不同时间点表达发生改变,且PTEN调控了Akt与CREB的表达,可能通过影响神经突触可塑性,参与偏头痛的发生发展过程。

参考文献:

[1] Buldyrev I, Tanner N M, Hsieh H Y, *et al*. Calcitonin gene-related peptide enhances release of native brain-derived neurotrophic factor from trigeminal ganglion neurons[J]. J Neurochem, 2006, 99(5): 1338-1350.

[2] Fraser M M, Bayazitov I T, Zakharenko S S, *et al*. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities[J]. Neuroscience, 2008, 151(2): 476-488.

[3] Moult P R, Cross A, Santos S D, *et al*. Leptin regulates AMPA receptor trafficking *via* PTEN inhibition[J]. J Neurosci, 2010, 30(11): 4088-4101.

[4] Yang L, Wang S, Sung B, *et al*. Morphine induces ubiquitin-proteasome activity and glutamate transporter degradation[J]. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21703-21713.

[5] Sui L, Wang J, Li B M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex[J]. Learn Mem, 2008, 15(10): 762-776.

[6] Ma W, Hatzis C, Eisenach J C. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation[J]. Brain Res, 2003, 988(1/2): 97-104.

[7] Tassorelli C, Nappi G, Joseph S A. Systemic nitroglycerin induces fos immunoreactivity in rat brain[J]. Exp Headache Models, 1995, 3(4): 229-234.

[8] Srikiatkhachorn A. Chronic daily headache: a scientist's perspective[J]. Headache, 2002, 42(6): 532-537.

[9] 陈力学, 康格非, 刘宝松. PTEN与缺血性脑损伤的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 312-314.

[10] Sun R Q, Tu Y J, Yan J Y, *et al*. Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin[J]. Pain, 2006, 120(1/2): 86-96.

[11] Xu J T, Tu H Y, Xin W J, *et al*. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats[J]. Exp Neurol, 2007, 206(2): 269-279.

[12] Qiao L Y, Grider J R. Colitis induces calcitonin gene-related peptide expression and Akt activation in rat primary afferent pathways[J]. Exp Neurol, 2009, 219(1): 93-103.

[13] Popova T, Espina V, Bailey C, *et al*. Anthrax infection inhibits the AKT signaling involved in the E-cadherin-mediated adhesion of lung epithelial cells[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009, 56(2): 129-142.

[14] Ditlevsen D K, Owczarek S, Berezin V, *et al*. Relative role of upstream regulators of Akt, ERK and CREB in NCAM- and FGF2-mediated signalling[J]. Neurochem Int, 2008, 53(5): 137-147.

[15] Maneyapanda S B, Venkatasubramanian A. Relationship between significant perinatal events and migraine severity[J]. Pediatrics, 2005, 116(4): e555-e558.

[16] 袁辉, 杨胜, 周文霞, 等. MAPK级联信号通路与长时程增强[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 769-774.

[17] Mayer S I, Thiel G. Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB[J]. Eur J Cell Biol, 2009, 88(1): 19-33.

(**收稿**:2010-03-03;**修回**:2010-04-08)

(编辑 栾 嘉)