文章编号:1000-5404(2010)11-1199-04

论著

PTEN 对原代培养大鼠海马神经元牵张损伤后 GluR2 受体亚单位定位表达的调节作用

许民辉[1],程 远[1],周 椿[2],沈光建[2],徐伦山[2],易 良[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科[1]; 400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨第 10 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)对大鼠原代海马神经元牵张损伤后 AMPA 受体 GluR2 亚单位定位表达的调节作用。**方法** 选用新生 SD 大鼠培养原代海马神经元,建立神经元牵张损伤模型,利用 RNAi 慢病毒载体敲减神经元中 PTEN 基因的表达。采用 Tunel 染色评估神经元牵张各时相点的损伤情况。采用 Western blot 检测牵张各时相点 AMPA 受体 GluR2 亚单位在细胞中的表达定位变化。**结果** 慢病毒介导的 RNAi 能有效下调 PTEN 基因的表达。PTEN 基因表达下调后,0、2、6 h 细胞凋亡比例无明显差异,但 24 h 细胞凋亡比例由(68.7% ±5.1%)下降至(39.3% ±3.5%),48 h 细胞凋亡比例由(76.7% ±5.3%)下降至(52.0% ±4.3%)。神经元细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量在牵张损伤 6、24、48 h 明显降低。下调 PTEN 基因的表达后,神经元细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量在牵张损伤 6 h 无明显降低,牵张损伤 24、48 h 后降低。细胞损伤 6、24、48 h 时,下调 PTEN 基因的表达能够明显上调神经元细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量。**结论** 海马神经元受到机械性牵张损伤后,下调 PTEN 的表达能够有效地阻止 AMPA 受体 GluR2 亚单位在细胞膜上定位的降低,降低凋亡细胞比例。PTEN 对 AMAP 受体的调节作用可能为预防和治疗脑创伤提供一条新途径。

[关键词] 脑损伤;AMPA 受体;PTEN
[中图法分类号] R-332; R394.3; R651 **[文献标志码]** A

The effect of PTEN in the regulation on localization of AMPA recepter subunit GluR2 in hippocampal neuron after stretch injury

Xu Minhui[1], Cheng Yuan[1], Zhou Chun[2], Shen Guangjian[2], Xu Lunshan[2], Yi Liang[2] ([1] Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2] Department of Neurosurgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] Objective To explore the effect of PTEN in the regulation on localization of AMPA recepter subunit GluR2 in rat hippocampal neuron after stretch Injury. Methods Cultured the primary rat hippocampal neuron from neonate rats and established the model of stretch injury. Utilized RNAi-lentvirus to inhibit the expression of PTEN gene. Used Tunel dyeing to assess injury of neurons and used Western-blot to investigate localization of AMPA recepter subunit GluR2 in rat hippocampal neuron after stretch Injury. Results RNAi-lentvirus can down regulated expression of PTEN gene effectively. There was no evidently difference in cellular apoptotic rates at 0 h, 2 h and 6 h, but the celluar apoptotic rate descreased from 68.7% ±5.1% to 39.3% ±3.5% at 24 h and from 76.7% ±5.3% to 52.0% ±4.3% at 48 h. AMPA recepter subunit GluR2 descreased evidently at 6 h, 24 h and 48 h. When decresase expression of PTEN, AMPA recepter subunit GluR2 descreased evidently at 24 h and 48 h, but there was no evidently descrease at 6 h after injury. Downregulation on PTEN can obviously increase the AMPA recepter subunit GluR2 at 6 h, 24 h and 48 h. Conclusion Downregulation of PTEN can inbibit the decrease of AMPA recepter GluR2 subunit in cell membrane of neuron after stretch injury, prevent the apoptosis of neuron. The function of PTEN to AMPA recepter may provides a new way for the prevention and treatment of traumatic brain injury.

[Key words] traumatic brain injury; AMPA recepter; PTEN

Corresponding author: Cheng Yuan, E-mail: yuancheng@163.com

[通信作者] 程 远,E-mail: yuancheng@163.com

PTEN基因,即第10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),可参与谷氨酸(Glu)受体-N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体磷酸化的调控过程,导致NMDA受体兴奋性增加致使Glu作用下细胞内Ca^{2+}超载和神经元凋亡[1]。研究表明,神经元细胞膜的Ca^{2+}通透性同样也受到Glu的另一受体-α-氨基羟甲基恶唑丙酸(AMPA)受体中GluR2亚单位的调控[2],但PTEN是否参与了GluR2亚单位表达的调节尚不清楚。本研究通过RNAi慢病毒载体降低PTEN的表达水平,观察PTEN对AMPA受体GluR2亚单位表达的调节作用以及对神经元凋亡比例的影响。以期为以PTEN为靶点预防和治疗脑创伤(traumatic brain injury, TBI)的临床策略提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 大鼠海马神经元的原代培养及细胞牵张装置的制备和牵张方法

20只健康7日龄SD大鼠(购于第三军医大学实验动物中心),清洁级,雌雄不拘,体质量12~16 g。75%的乙醇消毒后断头置于D-Hanks平衡盐溶液中。无菌条件下分离出双侧海马组织,剪成约1 mm×1 mm×1 mm小块,加入5倍体积的0.125%胰酶,37 ℃消化10 min,中间轻轻振摇2~3次,用含20% FBS的DMEM终止消化,400目筛网过滤。将过滤得到的细胞悬液移入离心管中,1 000 r/min离心5 min。去除上层培养液,加入新培养液,用吸管轻轻吹打,重新悬浮细胞。以1×10^6个细胞/ml的浓度接种于包被有多聚赖氨酸的培养板中,置于5% CO_2、37 ℃培养箱中培养,48 h后使用阿糖胞苷处理细胞48 h去除其中的增殖细胞,每3天换液1次,每次换半量。使用的是含有体积分数10%胎牛血清、青霉素1 U/L单位和链霉素100 mg/L单位的DMEM-F12培养基进行培养。上述试剂均购自美国Hyclone公司。

裁取3.6 cm×6.4 cm大小的硅酮膜,硅酮膜两端各使用硅胶粘着固定3.6 cm长硅胶管(内径1.5 mm,外径3 mm),于直径12 cm的培养皿内选取7.2 cm×3.6 cm区域,4角分别黏着固定一段5 mm硅胶管。牵张时,7 cm长的钢针穿过硅酮膜两端的硅胶管,向两端牵拉硅酮膜并将其固定于支架上,此时硅酮膜牵张延长约10%(误差0.3 mm内),分别记录神经元牵张损伤0、2、6、24和48 h后细胞凋亡率、总蛋白中AMPA受体GluR2亚单位含量等指标。

1.2 PTEN基因RNAi慢病毒载体制备

设计PTEN siRNA序列:GTATAGAGCGTGCAGATA;另设计1个无序序列:TTCTCCGAACGTGTCACGT。根据病毒载体p-GCL-GFP构建框架合成4对DNA片段,将DNA-oligo正义链和反义链退火成双链DNA。*Hpa* Ⅰ和*Xho* Ⅰ 37 ℃酶切p-GCL-GFP载体2 h,4 ℃连接12 h,将双链DNA插入线性化的载体,转化,挑选阳性克隆PCR鉴定,并测序。将构建好的RNAi病毒载体质粒,按使用说明共转染入293T细胞,36~48 h后收获细胞,采用Western blot方法检测PTEN蛋白的表达,判断干扰效果。将RNAi慢病毒载体和两种辅助包装原件载体质粒p-Helper 110载体、p-Helper 210载体,共转染293T细胞。8 h后更换为完全培养基,继续培养48 h,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,使用Plus 20离心超滤装置对其进行浓缩,在293T细胞中测定病毒滴度。取待测定的病毒原液10 μl,10倍倍比稀释。293T细胞铺96孔板,每孔加1×10^4个细胞,体积为100 μl,37 ℃培养24 h。吸去90 μl培养基,加入90 μl倍比稀释病毒液,继续培养24 h,加入完全培养基100 μl。72 h后,数出荧光细胞比例在10%左右的孔中的荧光细胞个数,将得到的数值乘以相应的稀释倍数,即可得到病毒原液的滴度,用TU/ml(感染单位/ml)表示。

1.3 凋亡细胞膜蛋白中AMPA受体GluR2亚单位的含量和总蛋白中PTEN的含量检测

采用TUNEL法检测凋亡细胞(试剂盒购自美国Oncor公司)总蛋白提取:收集细胞,经PBS冲洗后,RIPA裂解细胞,12 000×*g*、4 ℃离心10 min,收集上清。膜蛋白提取:配制疏水性蛋白提取液:1% Triton X-114,150 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,调pH值至8.0备用。细胞于4 ℃条件下15 000×*g*离心15 min,用1ml含有5 mmol/L $MgCl_2$的PBS洗涤3次,最后于4 ℃条件下15 000×*g*离心15 min收集细胞。加入1 ml冷提取液,于4 ℃条件下放置2 h,17 000×*g*离心10 min,去除沉淀取上清。将上述上清中的Triton X-114含量增加到2%,再加入20 mmol/L的$CaCl_2$抑制部分蛋白酶活性,37 ℃条件下放置10 min使其分层。室温下1 000×*g*离心10 min使液相和去污相充分分层。将液相和去污相分开,分别用10倍体积的冷丙酮在冰上沉淀45 min。于4℃条件下17 000×*g*离心30 min,用去离子水洗涤沉淀3次。将沉淀溶解在1% SDS溶液中。以BSA为标准蛋白,采用BCA法蛋白定量。20 μg总蛋白10 % SDS-PAGE电泳分离,转移到硝酸纤维素膜上,20 g/L脱脂奶粉-TBS溶液室温封闭1 h,先后加入相应一抗和二抗孵育,化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光,冲洗。结果经扫描后用Bandscan 5.0软件行灰度扫描,将其灰度与内参灰度对比,以对比值表示相对表达强度。

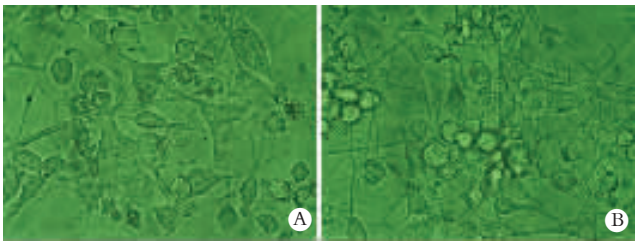
1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 原代大鼠海马神经元培养

倒置相差显微镜下观察,刚接种的细胞1 h后开始贴壁,呈圆形,体积小,透亮,散在分布。12 h后细胞几乎全部贴壁,且长出短小的突起。接种3~5 d后细胞有明显增长的突起连接形成稀疏的网络,胞体呈三角形或椭圆。接种7 d后,神经元细胞体进一步增大,折光性强,有明显立体感,核仁清晰可见,突起增粗增长,连接成网,细胞体核突起光晕明显(图1)。接种10 d后,细胞体积继续增大,胞体饱满,突起分支增多,形成致密的网络;利用神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体流式细胞仪检测证明90%为神经元。

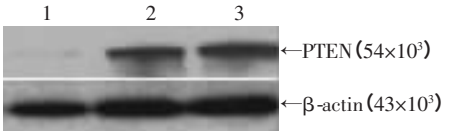


A:接种 7 d 后;B:接种 10 d 后

图 1　原代大鼠海马神经元不同培养时间细胞形态观察
（倒置显微镜 ×200）

2.2　重组慢病毒感染效率的测定及其对 PTEN 基因的敲减作用

将包装好的慢病毒颗粒梯度稀释后转染 293FT 细胞,倒置荧光显微镜下观察各孔中表达 GFP 的 293FT 阳性细胞数,表达 GFP 的细胞数乘以相应稀释倍数为病毒滴度,测定滴度为 6.3×10^6 TU/ml。以 MOI 为 1 感染原代海马神经元可见 60% 以上的细胞表达 GFP。以 MOI 为 10 感染原代海马神经元可见 90% 以上的细胞表达 GFP。1 周后,收获细胞,提取总蛋白,Western blot 方法显示感染针对目的基因 PTEN 的 RNAi 慢病毒 PTEN 基因表达弱,而感染阴性对照病毒后,PTEN 基因的表达没有明显变化,证明成功构建 PTEN 基因敲减细胞 Neuron-PTEN-ND 和感染阴性对照病毒细胞 Neuron-PTEN-NC(图 2)。



1:Neuron-PTEN-ND; 2: Neuron-PTEN-NC; 3 Neuron

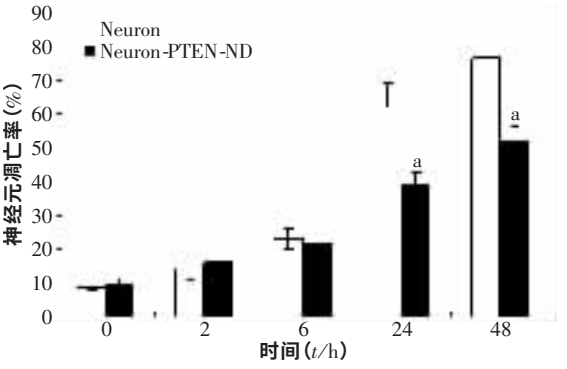
图 2　Neuron-PTEN-ND 细胞中 PTEN 蛋白的表达

2.3　TUNEL 法检测细胞凋亡评价牵张损伤后神经元的损伤情况

倒置相差显微镜下观察,Neuron 组牵拉损伤 2 h 后,可见神经元胞体肿胀。牵拉损伤 6 h 后,可见神经元胞体皱缩,部分细胞连接断裂,细胞网络变稀疏。牵拉损伤 24 h 后,可见神经元胞体皱缩明显,大部分细胞连接断裂,细胞仍贴壁,但可见许多悬浮死细胞,细胞数量略有减少,细胞网络消失。牵拉损伤 48h 后,可见神经元细胞数量明显减少,可见变性的神经元细胞及细胞碎片。Neuron-PTEN-ND 组在牵张损伤 0、2、6 h 形态变化和 Neuron 组基本一致,牵拉损伤 24、48 h 后细胞损伤情况明显较 Neuron 组轻。Tunel 染色证实,两组细胞在 0、2、6 h 凋亡比例无明显差异,但 Neuron-PTEN-ND 组在 24、48 h 细胞比例明显低于 Neuron 组(图 3、4)。

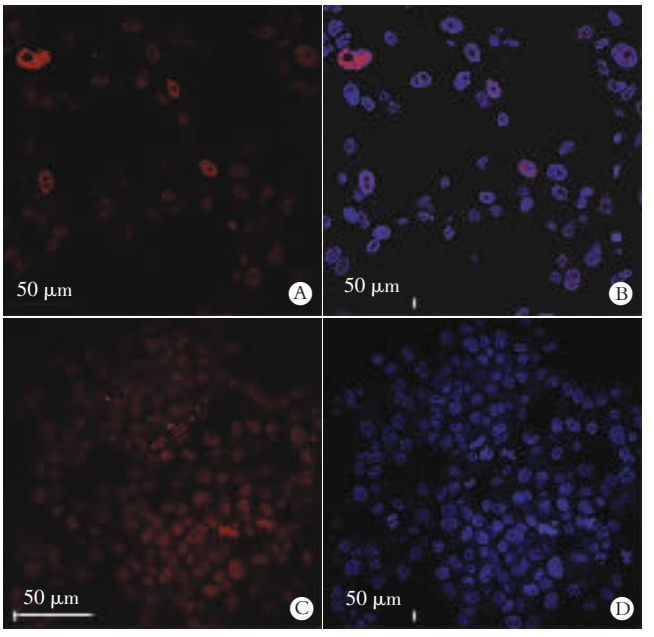
2.4　牵张损伤各时间点神经元总蛋白和膜蛋白中 AMPA 受体 GluR2 亚单位的表达水平

Western bolt 检测结果显示,牵张损伤各时相点,Neuron-PTEN-ND 组和 Neuron 组总蛋白中 AMPA 受体 GluR2 亚单位的含量均无明显的统计学差异(图 5)。Neuron 组细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量在牵张损伤 6、24、48 h 明显降低。Neuron-PTEN-ND 组细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量在牵张损伤 6 h 无明显降低,牵张损伤 24、48 h 后降低。细胞损伤 6、24、48 h 时,Neuron-PTEN-ND 组细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位含量明显高于 Neuron 组(图 6)。



a: $P<0.01$,与 Neuron 组比较

图 3　牵张损伤各时相点 Neuron-PTEN-ND 细胞的凋亡率



A、B:Neuron-PTEN-ND 组;C、D:Neuron 组

图 4　激光共聚焦显微镜观察牵张损伤 24 h 时 Neuron-PTEN-ND 组和 Neuron 组的细胞凋亡

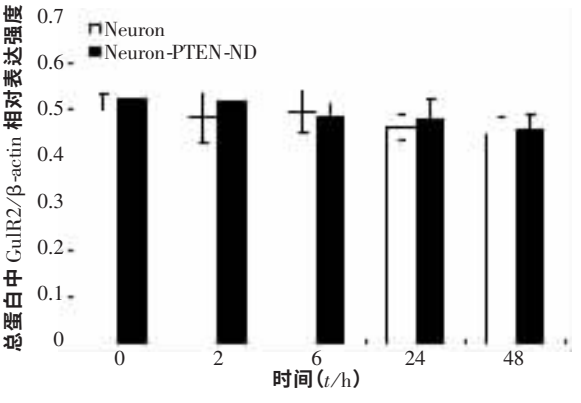
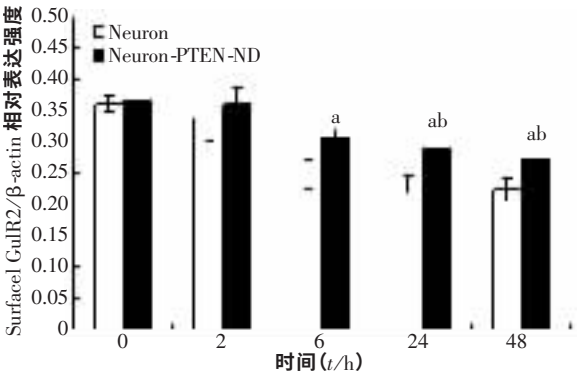


图 5　牵张损伤各时相点细胞总蛋白中 AMPA 受体 GluR2 亚单位的表达



a: $P<0.05$,与 Neuron 组比较; b: $P<0.05$,与 0 h 损伤组比较

图6 牵张损伤各时相点细胞膜蛋白中 AMPA 受体 GluR2 亚单位的表达

3 讨论

1997 年由 Li 等[3] 3 个研究小组同时发现并命名的 PTEN/TEP1/MMAC1 位于人染色体 10q23.3，是迄今为止发现的第 1 个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因[4,5]。目前的研究认为，PTEN 编码产物主要通过使磷脂酰肌醇 3，4，5-三磷酸(PIP3)去磷酸化而抑制磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)依赖的蛋白激酶 B(Akt)，导致细胞增殖抑制和细胞凋亡，这被认为是调节细胞凋亡和肿瘤发生的关键因素[6,7]。新近研究发现，神经元损伤后 PTEN 表达的上调是引起细胞内 Ca^{2+} 超载和神经细胞死亡的重要原因之一。TBI 时脑损伤区 Glu 释放急剧增多，细胞间隙 Glu 累积，致局部浓度显著升高，是 TBI 的重要分子机制[8,9]。PTEN 能够与 Glu-NMDA 受体的聚合体结构(NR_1/NR_{2B})直接结合形成复合物，通过磷酸酶作用正向调节突触外 NMDA 受体，使其活性增加。PTEN 下调可通过对 Akt 和突触外 NMDA 受体两种信号通路的调节，实现对神经元缺血损伤的保护作用。本研究中我们发现，通过 RNAi 下调 PTEN 表达后，牵张损伤各时间点神经元的凋亡比例明显降低[10]。

我们的前期研究发现，神经元牵张损伤后，PTEN 表达增加，细胞总蛋白中 AMPA 受体 GluR1、GluR2、GluR3 亚单位的表达水平损伤前后无明显的统计学差异，但细胞膜中的 AMPA 受体 GluR2 亚单位在牵张损伤后明显降低，细胞内 PTEN 水平与膜表面 GluR2 亚单位变化相反。AMPA 受体是神经元膜表面最为重要的 Glu 受体，特别是其 GluR2 亚单位与神经元的 Ca^{2+} 通透性的尤为密切。含有 GluR2 亚单位的 AMPA 受体不通透 Ca^{2+}，不含 GluR2 亚单位的 AMPA 受体则对 Ca^{2+} 具有很高通透性[2,5]。蛋白激酶和磷酸酶催化的磷酸化和去磷酸化过程尤为重要，二者决定了 AMPA 受体的转运、膜上表达及其通道的电生理特征。本研究中我们发现，抑制神经元损伤后 PTEN 表达水平的上调，能够有效降低神经元损伤后 GluR2 的在膜表面的缺失，而对总蛋白中 GluR2 无显著影响。我们推测 PTEN 磷酸酶可能参与了 AMPA 受体中 GluR2 亚单位的转运、表达和再聚合过程。高表达的 PTEN 导致了 AMPA 受体中 GluR2 亚单位在细胞膜表面的定位减少，使 AMPA 受体其对 Glu 的通透性增加，导致神经元内 Ca^{2+} 超载和细胞死亡[11]。因此，PTEN 可能是缺血性脑损伤的重要靶分子。

参考文献：

[1] Wu D N, Pei D S, Wang Q, *et al*. Down-regulation of PTEN by sodium orthovanadate inhibits ASK1 activation via PI3-K/Akt during cerebral ischemia in rat hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2006, 404(1-2): 98-102.

[2] Peng P L, Zhong X, Tu W, *et al*. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia[J]. Neuron, 2006, 49(5): 719-733.

[3] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.

[4] Zhang Q G, Wu D N, Han D, *et al*. Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury [J]. FEBS Lett, 2007, 581(3): 495-505.

[5] Kwon C H, Luikart B W, Powell C M, *et al*. PTEN regulates neuronal arborization and social interaction in mice[J]. Neuron, 2006, 50(3): 377-388.

[6] Montero M, Nielsen M, Ronn L C, *et al*. Neuroprotective effects of the AMPA antagonist PNQX in oxygen-glucose deprivation in mouse hippocampal slice cultures and global cerebral ischemia in gerbils[J]. Brain Res, 2007, 1177: 124-135.

[7] Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, *et al*. Implication of PTEN in production of reactive oxygen species and neuronal death in *in vitro* models of stroke and Parkinson's disease[J]. Neurochem Int, 2007, 50(3): 507-516.

[8] Liu B, Liao M, Mielke J G, *et al*. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites[J]. J Neurosci, 2006, 26(20): 5309-5319.

[9] Bonde C, Noraberg J, Noer H, *et al*. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures [J]. Neuroscience, 2005, 136(3): 779-794.

[10] Wang W P, Iyo A H, Miguel-Hidalgo J, *et al*. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons[J]. Brain Res, 2006, 1084(1): 210-216.

[11] Gardner S M, Takamiya K, Xia J, *et al*. Calcium-permeable AMPA receptor plasticity is mediated by subunit-specific interactions with PICK1 and NSF[J]. Neuron, 2005, 45(6): 903-915.

(**收稿**:2010-03-05;**修回**:2010-04-22)

(编辑 王 红)