神经病学研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0673-04

下调 PTEN 基因对全脑缺血大鼠学习记忆能力和 CREB表达的影响

陈力学，熊 新，桂 蓓，周冀英
（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，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨下调第 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 chromo some ten，PTEN）对全脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（cAMP response element- binding protein，CREB）的表达调控作用。方法：采用海马局部注射 pshRNApten 基因质粒，建立 SD 大鼠全脑缺血再灌注模型，利用体感诱发电位（Somatosensory evoked potential，SEP）和穿梭箱分别检查大鼠功能和行为学变化，RT-PCR 和免疫组化检测海马神经元 CREB mRNA 和蛋白的表达。结果：穿梭箱实验发现 pshRNApten 各治疗组主动回避反应（Active avoiding reaction，AAR）习得率较 pshGFP 组明显提高；SEP 检查显示，pshRNApten 组较 pshGFP 组波幅明显上升，峰潜伏时缩短；pshRNApten 组海马神经元 CREB 基因的 mRNA 和蛋白表达量较对照组明显上升；以上结果差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。结论：下调 PTEN 基因能增强全脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力，其机制可能与下调 PTEN 引起 CREB 表达量增加有关。

【关键词】第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因；全脑缺血；体感诱发电位；穿梭箱；转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白
【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-28

Effects of PTEN down-regulation on learning and memory abilities and CREB expression in rats with global cerebral ischemia

CHEN Li-xue，XIONG Xin，GUI Bei，ZHOU Ji-ying
（*Laboratory Research Center，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effects of PTEN down-regulation on learning and memory abilities after global cerebral ischemia in rats. *Methods*：The experimental therapy model after global cerebral ischemia and reperfusion was established by four-vessel occlusion (4VO)after 2 days of pshRNApten injected into the hippocampal cell layer of SD rats.The behavioral effects were measured with somatosensory evoked potential(SEP)and computerized shuttle-training case respectively.The expression of CREB was analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry method. *Results*：Compared with the pshGFP group，the AAR（active avoiding reaction）with computerized shuttle-training case in the pshRNApten group raise markedly in the first and second week.Results of somatosensory evoked potential (SEP)in pshRNApten group showed that the latency period of P1 wave shorten markedly and P1-N1 amplitude increase significantly after ischemia and reperfusion（$P<0.05$）.The expression of rat hippocampal CREB with immunohistochemieal method and RT-PCR was obviously increased in pshRNApten treatment groups compared to pshGFP groups. *Conclusion*：Downregulating PTEN could enhance learning and memory ability and improve neuronal function，which changes were correlated with the increase of CREB.

【Key words】Phosphatase and tensin homolog deleted on chromo some ten (PTEN)；global cerebral ischemia and reperfusion；somatosensory evoked potential(SEP) active avoiding reaction；AAR；cAMP response element- binding protein(CREB)

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。陈力学等[1,2]人应用 RNAi 技术构建 shRNApten 载体下调 PTEN 基因的表达后，发现神经元 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 2B 亚单位（N-methyl-D-aspartate receptor 2B，NMDAR2B），简写 NR2B。酪氨酸磷酸化水平降低，Ca^{2+}内流减少，凋亡或坏死神经元数量减少，从而实现对脑缺血大鼠海马神

作者介绍：陈力学（1973-），男，助理研究员，博士，
研究方向：中枢神经系统继发性损害发生机制。

基金项目：重庆市卫生局医学科研资助项目（编号：2009-2-357）；
重庆市教委科研资助项目（编号：KJ100316）。

经元损伤的保护作用。但下调 PTEN 对脑缺血大鼠学习记忆能力及行为学改变的作用和效果尚未见报道，且其机制仍不清楚。本研究利用体感诱发电位（Somatosensory evoked potential，SEP）和穿梭箱检查分别从功能和行为学方面，对下调 PTEN 基因治疗脑缺血再灌注大鼠后，对其学习记忆能力和功能进行评价，并探讨转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（cAMP response element- binding protein，CREB）在脑缺血损伤学习记忆中的作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠全脑缺血的 pshRNApten 实验治疗模型及其分组

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠（由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供）36 只，质量（250±20）g。用立体定位仪海马部位注射按照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明优化转染条件购自武汉晶赛公司的 pshRNApten 质粒 2 μl（质粒制备的详细方法和鉴定结果可参见本人发表的文章[1,2]），部位在前囟后 3.5 mm、中线旁开 1.6 mm、深 3.0 mm 处）；注射 2 d 后，参照 Pulsinelli 四血管阻断致全脑缺血方法，首先将双侧椎动脉烧闭，次日分离暴露双侧颈总动脉，夹闭 5 min 后恢复颈总动脉供血，实验分组为：正常对照组（只加脂质体）、无关对照 pshGFP 组、pshRNApten 治疗组；每组又分再灌注后 3、7、14 d 3 个时间点。并于再灌流不同时相点，分别进行各种行为学检测和取材检测 CREB 的 mRNA 和蛋白表达量。

1.2 SEP

以银球电极作记录电极，切开头颅后部皮肤，用牙科钻于前囟后 1 mm、矢状缝左侧旁开 2 mm 处将颅骨钻一直径约 2 mm 的小孔（注意避免打穿硬脑膜，损伤皮层）。将一银球电极经颅骨小孔轻触于硬膜外，接地电极置于背部皮下，参考电极置于头皮，电极引出的屏蔽导线与 Powerlab/16SP 电生理记录系统（澳大利亚）相连，刺激电极位于右侧胫后，SEP 记录滤波频率为 10 kHz，扫描时间 250 ms，自动叠加128 次，方波刺激，波宽 200 μs，刺激频率 3 Hz，刺激强度 7.3 mA。测定在屏蔽室内进行，室温 26℃~28℃，光线柔和，安静。测得的 SEP 波形中第 1 个正波称 P1 波，其后的第 1 个负波称 N1 波，随后出现的正、负波分别称 P2、N2 .....；潜伏期指刺激开始至 P1 波波峰间的时间，单位为 ms；波的幅值为波峰至基线的垂直距离，单位为 μV。经滤波、放大和数字转换后输入计算机，应用 Scope 3.7.1 软件进行数据采集、保存和分析。

1.3 穿梭箱检查

于术后相应时间点分别进行穿梭箱检查，电脑控制的穿梭箱系统由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第五研究室研制，以灯光为条件刺激，电击为非条件刺激。先将动物放入箱内暗适应 2 min，使其熟悉环境，开始时给予持续灯光刺激 5 s，如大鼠不逃至另一端（穿梭），则给予电击（给箱底通电流 5 mA，频率 15 Hz 的电刺激），使动物逃至箱底不通电的另一端，此时电击停止，否则持续受电击 5 s，间隔 2 min 后再给予光刺激，开始下一轮训练，每次试验进行 20 次光、电刺激。如大鼠在灯光刺激后，立即能完成穿梭动作称主动回避反应（Active avoidance response，AAR）；而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应（Passive avoidance response，PAR）；不能完成穿梭动作则认为失败（Fail）。本实验中大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数（20 次）的比值即 AAR 比率代表。

1.4 RT-PCR 检测 CREB mRNA 的表达

各组动物分别在相应时间点断头取脑，分离海马组织区；用 TRIzol 法抽提总 RNA，根据 ToYoBo 逆转录试剂盒（目录号：FSK-100）和 PCR 试剂盒（目录号：KOD-101）说明书进行操作，检测 CREB mRNA 表达量。CREB（391 bp）和 β-Actin（227 bp）内参序列为（CREB-F:5'-TTGCCACATTAGCCCAGGTA-3'，R:5'-GTTTGGTAAATCGGGGTTGG-3'；Actin-F:5'-GGACTCATCGT ACTCCTGCT-3'，ActinR:5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'）。用 Quantity One 4.6 软件对琼脂糖凝胶电泳图进行图像分析，计算目的基因电泳条带的光密度值与各自的 β-Actin 内参的比值，然后以样本/对照的比值表示基因表达水平。

1.5 免疫组化法测 CREB 蛋白的表达

冰冻切片进行免疫组化检测 CREB 蛋白的表达，方法按北京中杉公司说明书进行（目录号：SP-9000，略有改动）。应用图像分析系统进行分析，计算所要观察部位的 CREB 表达的积分光密度（Integral optical density，IOD）。

1.6 数据处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，成组设计的 2 组间均数比较采用 t 检验，多组均数与同一均数的比较采用方差分析，$P<0.05$ 表示2组数据间差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SEP 变化

pshGFP 组各时相点同正常组相应时点比较，P1 波潜伏期和波幅差异有统计学意义（$P<0.05$），前者较后者在峰潜伏时和波幅方面均有不同程度的延长和降低，P1-N1 波的波幅下降与 P1 波潜伏期延长的变化规律基本一致；而pshRNApten 治疗组与 pshGFP 组相比，其 P1 波潜伏期缩短和 P1-N1 波幅增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结果提示，全脑缺血再灌注 P1 波潜伏期延长，波幅下降；用 pshRNApten 治疗可以明显改善鼠的大脑功能和电生理活动（见表 1）。

表 1 全脑缺血/再灌注大鼠 SEP 的 P1 波峰潜伏期（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

分组	P1 波峰潜伏期（ms）		
	3 d	7 d	14 d
正常组	15.57 ± 0.72*	15.77 ± 0.68*	15.67 ± 0.75*
pshGFP组	18.62 ± 0.89#	20.42 ± 1.39#	21.35 ± 1.59#
pshRNApten组	17.12 ± 0.40*#	17.02 ± 0.44*	16.37 ± 0.92*

注：*，$P<0.05$ 与 pshGFP 组比较；#，$P<0.05$ 与正常组比较

2.2 穿梭箱检查结果

pshGFP 组 AAR 习得率各相应时间点与正常组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；pshRNApten 组与 pshGFP 组 AAR 相比各相应时间点明显提高（$P<0.05$）。结果提示全脑缺血再灌注大鼠学习、记忆能力下降，经 pshRNApten 治疗后大鼠学习、记忆能力有所提高（见表 2）。

表 2 大鼠穿梭箱 AAR 习得率结果（%，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

分组	术后		
	3 d	7 d	14 d
正常组	86.25 ± 6.29	87.50 ± 6.45	83.75 ± 4.78
pshGFP组	49.75 ± 4.11	45.50 ± 3.31	41.25 ± 4.78
pshRNApten组	66.50 ± 6.24*	58.25 ± 5.37*	72.75 ± 2.63*

注：*，$P<0.05$ 与 pshGFP 组比较

2.3 CREB mRNA 检测结果

质粒转染大鼠后，与 pshGFP 对照组相比，pshRNApten组 CREB mRNA 表达量在第 3、7、14 天时均明显上升（$P<0.05$）；正常组和 pshGFP 对照组相比，正常组明显高于对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。说明 pshRNApten 质粒能明显升高 CREB 的 mRNA 水平（如图 1）。

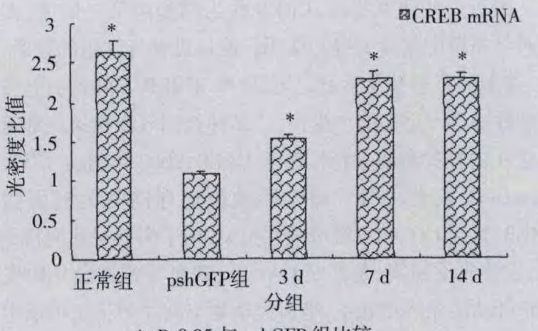
2.4 CREB 免疫组化检测结果

细胞被染成棕黄色者为基因表达阳性细胞，在每张切片随机选取 10 个高倍视野进行图像分析，各组所选取部位相同。染色越深，IOD 值越大，反映细胞内蛋白表达量越高，反之则表达量越低。正常组与 pshGFP 组相比，pshGFP 组 IOD值明显低于正常组（$P<0.05$）。与 pshGFP 组相比 pshRNApten 各治疗组 CREB 阳性细胞 IOD 值明显增加（$P<0.05$），且细胞数量也有所增加；其中 14 d 时 pshRNApten 组增加幅度最大（约为 38%）。在 3 d 和 7 d 两个治疗组之间，CREB 阳性细胞IOD 值变化不显著（如图 2）。

3 讨 论

脑缺血时，血脑屏障被破坏，大量兴奋性氨基酸（Excitatory amino acids，EAA）尤其是谷氨酸（Glutamic acid，Glu）的大量释放，EAA 受体过度激活，产生一系列病理过程，引起胞外 Ca^{2+}超载、自由基生成增多等一系列生化改变，造成神经元损伤，当脑缺血达一定程度和时间可引起学习记忆障碍、

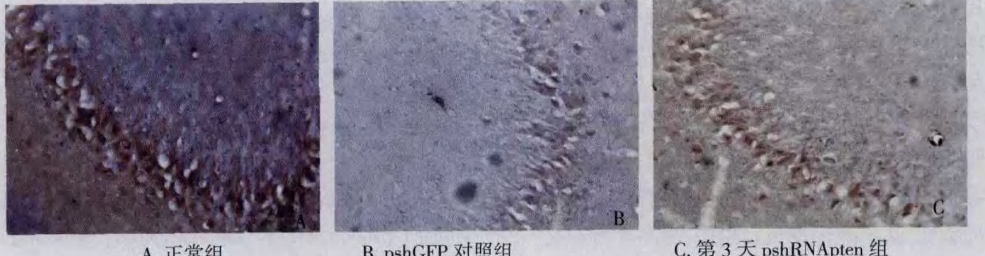




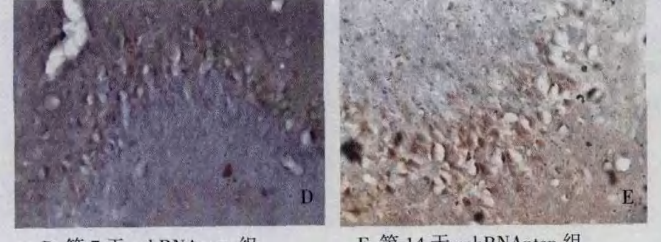
*：$P<0.05$ 与 pshGFP 组比较

Lane M. DL2000 Marker；1. 正常对照组；2. pshGFP 对照组；3. 第 3 天 pshRNApten 组；4. 第 7 天 pshRNApten 组；5. 第 14 天 pshRNApten组

图 1 PTEN 基因治疗后脑缺血大鼠海马区 CREB mRNA 的表达



A. 正常组　B. pshGFP 对照组　C. 第 3 天 pshRNApten 组



D. 第 7 天 pshRNApten 组　E. 第 14 天 pshRNApten 组

图 2 PTEN 基因治疗后脑缺血大鼠海马区 CREB 蛋白表达量

行为学改变以及电生理学的各种级联反应[2,3]。因此，对神经行为学功能的评价是评价脑缺血治疗的重要手段。本研究应用穿梭箱和 SEP 对 PTEN 基因下调后脑缺血大鼠的学习记忆能力和功能进行评价。

穿梭箱学习的机制是通过测试大鼠形成新的条件反射的能力和保持新学会的条件反射的能力来反映大鼠的学习、记忆能力，敏感而易行。本实验观察到，pshRNApten 治疗组较对照组，AAR 习得率明显提高。SEP 检测有助于缺血性脑血管病的诊断，SEP 能特异地记录外周刺激大脑感觉中枢的电活动，它是很多神经元电活动的综合效应，能提供较多的定量分析指标[4,5]。本研究结果显示，pshGFP 组 SEP 结果显示波幅下降，峰潜伏时延长，随着缺血再灌注时间的延长，波幅下降及潜伏时间延长更明显，说明神经元受损严重。pshRNApten 治疗组，SEP 检查显示，7 d 和 14 d 时波幅上升，峰潜伏时缩短，说明大鼠神经元功能有所恢复。以上结果说明下调 PTEN 可以增强全脑缺血大鼠学习能力。Ke 等[6]利用 siRNAs 技术下调 PTEN 基因治疗全脑缺血后大鼠，发现其对神经元有显著的保护作用，其研究结果与本研究有相似之处，不同之处在于本研究从大鼠行为学以及电生理学方向进一步评价这种保护作用的效果。

最近一些研究指出，CREB 作为细胞内第三信使，在中枢神经系统中起着关键的作用，能促进神经细胞的存活、再生、突触的可塑性及学习记忆等[7,8]。CREB 下降可引起突触可塑性和学习记忆能力受损，许多神经调节物和递质都通过神经元内各种激酶途径汇集于 CREB，2007 年 Han 等[9]人在 Science 上发表文章，确定影响记忆存储的关键蛋白为 CREB，且与 LTP 和突触可塑性相关。由于海马对缺血特别敏感，它首先受损害，尤其是 CA1 区；缺血导致神经元缺失并与神经功能缺陷相联系，啮齿类动物空间学习记忆中枢定位在海马，损害海马则影响空间学习记忆[10]。本研究 CREB 的结果显示，pshRNApten 治疗组大鼠海马区 CREB 的 mRNA 和蛋白表达量较 pshGFP 组明显增加。结合行为学和神经功能检测结果，我们可以认为海马区神经元的损伤造成学习、记忆障碍，其机制可能是由于 PTEN 基因下调，引起 PI3K/Akt 信号通路活性增加，继而通过胞内 Ca^{2+} 使海马区 CREB 增加，达到改善大鼠学习记忆的目的。同时，韦永琼等[11,12]人在脑血管性痴呆的研究中发现，下调 PTEN 基因可通过 PI3K/Akt 和 ERK 来增加CREB 的表达，从而改善脑血管性痴呆大鼠神经元突触可塑性，达到减轻神经元损伤、提高学习记忆和神经保护的目的，其研究结果与本研究结果相似。

总之，本研究采用大鼠四血管阻断法导致全脑缺血的模型，在此模型的基本上，通过检测海马区 CREB 的变化，同时结合运动功能的改善和电生理功能检测结果的好转等情况，来综合评价下调 PTEN 基因的防治效果，但由于基因治疗的影响因素多，所以其具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 陈力学，姜利人，刘宝松，等.PTEN 表达下调对神经元缺氧损伤的保护及其作用机制[J].第三军医大学学报，2006，28(19)：1942-1944.

[2] 陈力学，刘宝松，石少权，等.下调 PTEN 基因对缺氧损伤后海马神经元 NR2B 受体调控机制研究[J].重庆医科大学学报，2010，35(4)：493-496.

[3] Ni J，Ohta H，Matsumoto K，et al.Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J].Brain-Res，1994，653(1-2)：231-236.

[4] Frigeni V，Miragoli L，Grotti A，et al.Comparative study between gadobenate dimeglumine and gadobutrol in rats with brain ischemia:evaluation of somatosensory evoked potentials[J].Invest Radiol，2001，36(10)：561-572.

[5] 陈力学，姜利人，刘宝松，等.脑缺血后体感诱发电位和脑电图波谱特征的变化及其与细胞凋亡的关系[J].中国危重病急救医学，2006，18(4)：196-199.

[6] Ning K，Pei L，Liao M G，et al.Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN[J].J Neurosci，2004，24(16)：4052-4060.

[7] Daniela Puzzo，Ottavio Vitolo，Fabrizio Trinchese，et al.Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity[J].J Neurosci，2005，25(29)：6887-6897.

[8] Tong L，Balazs R，Thornton P L，et al.Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons[J].J Neurosci，2004，24(30)：6799-6809.

[9] Han J H，Kushner S A，Yiu A P，et al.Neuronal competition and selection during memory formation[J].Science，2007，316(5823)：457-460.

[10] 郑先振，马光瑜.纳洛酮对血管性痴呆大鼠空间学习记忆减退的防治作用[J].中国行为医学科学，2002，11(6)：606-609.

[11] 韦永琼，陈力学，周冀英，等.下调 PTEN 对血管性痴呆大鼠海马神经元 CREB 的调节作用[J].中国老年学杂志，2010，30(24)：3720-3723

[12] Wei Y Q，Chen L X，Zhou J Y，et al.Effects of AdR-siPTEN on learning capability，memory and extracellular signal-regulated kinase expression in hippocampus of rats with vascular dementia[J].African Journal of Biotechnology，2010，9(28)：4457-4465.

（责任编辑：关蕴良）