基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0493-04

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

陈力学[1],刘宝松[2],石少权[3],周冀英[1],桂 蓓[1],邵 阳[2]

(1.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;2.第三军医大学大坪医院野战外科研究所三室,重庆 400042;3.中山大学附属第五医院妇产科,珠海 519000)

【摘 要】目的:探讨用 RNAi 干扰技术下调第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)对缺氧损伤引起的神经元 NR2B 受体表达调控机制。方法:建立海马神经元培养缺氧缺糖(Oxygen-glucose deprivation,OGD)损伤模型,转染 shRNAspten-GFP 质粒,采用细胞比色分析(Colorimetric assay)法观察神经元膜表面 NR2B 含量,RT-PCR 测定 NR2B 受体的 mRNA 的表达,采用 Fura 2-AM 法测定胞内 Ca^{2+} 浓度,AlamarBlue 进行神经元活力分析。结果:shRNAspten-GFP 能成功转染到神经元中;细胞比色法显示神经元膜表面有大量 NR2B 表达,与 PshGFP 对照组相比 shRNAspten 治疗组 NR2B 含量明显降低($P<0.05$),RT-PCR 测定结果与细胞比色法结果基本一致;OGD 损伤组比正常组胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高($P<0.05$),转染 PTEN 基因后胞内 Ca^{2+} 浓度比 PshGFP 对照组明显降低($P<0.05$);无关对照 PshGFP 组神经元活力较正常对照组和治疗组均有显著下降($P<0.05$)。结论:下调 PTEN 基因可降低 NR2B 的表达,阻断 Ca^{2+} 内流,增加细胞活力,从而保护神经元损伤。

【关键词】PTEN;shRNAs;Fura 2-AM;AlamarBlue 测定;细胞比色分析

【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-12

The regulation mechanism of shRNAspten to NR2B after neuron subjected to anoxia insult

CHEN Li-xue, et al

(*Laboratory Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the regulation of PTEN with RNAi on NR2B after OGD. *Methods*: In the OGD model with anaerobic gas mixture and deoxygenated, glucose-free extracellular solution, shRNAspten-GFP and unrelated control plasmid PshGFP transfection were done respectively. The quantities of NR2B in the neuronal membrane were quantitatively measured with colorimetric assay, and the expression of NR2B mRNA were analyzed by RT-PCR. The neuronal activity was analyzed by AlamarBlue and

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:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2007BB5287)。

stimulated murine peritoneal macrophages[J].J Immunol 1990,144(6):2343-2350.

[8] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications[J]. J Clin Invest,2002,110(7):905-911.

[9] Kunjathoor V V,Febbraio M,Podrez E A,et al. Scavenger receptors class A-Ⅰ/Ⅱ and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages[J]. J Bio Chem, 2002, 277(51): 49982-49988.

[10] Greaves D R,Gordon S.Thematic review series:The immune system and atherogenesis,Recent insight into the biology of macrophage scavenger receptors[J]. J lipid res,2005, 46(1):11-20.

[11] Bensinger S,Tontonoz P.*Integration of metabolism and inflammation* by lipid-activated nuclear receptors[J].Nature,2008,454(7203):470-477.

[12] Maxwell K, Soccio R, Duncan E ,et al. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice[J]. J Lipid Res,2003, 44(11): 2109-2119.

[13] Venkateswaran A,Laffitte B A,Joseph S B,et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR[J]?Proc.Natl. Acad. Sci. USA,2000,97(22):12097-12102.

[14] Kim W,Hwang H,Kim D,et al.Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis:CD5L and ApoE as potential biomarkers[J]. Exp Mol Med, 2008, 40(6): 677-685.

[15] Gangadharan B,Antrobus R, Dwek R,et al.Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients[J].Clin Chem,2007,53(10): 1792-1799.

[16] Wu J, Kobayashi M, Sousa E,et al. Differential proteomic analysis of *bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen* challenge[J]. Mol Cell Proteomics,2005,4(9):1251-1264.

(责任编辑:冉明会)

intracellular free calcium concentration were measured with Fura-2 AM by laser confocal microscope (LCM). *Results*: shRNAspten-GFP plasmid can been expressed successfully in cultured neurons. The study demonstrated that there are numerous NR2B subunit expression on neuronal membrane by colorimetric assay(OPD) assay and RT-PCR. The expression and quantity of neuronal NR2B with shRNAspten -GFP treatment was significantly decrease after oxygen and glucose deprivation (OGD) and reperfusion ($P<0.05$). The neuronal activity with shRNAspten-GFP treatment after OGD was significantly higher than that of PshGFP group ($P<0.05$). But intracellular free calcium concentration with shRNAspten-GFP treatment after OGD was significantly lower than that in OGD group and PshGFP group ($P<0.05$). *Conclusion*: PTEN down-regulation could effectively decrease NR2B expression level induced by OGD, and then block Ca^{2+} influx and increase neuronal activity, which protect neuron from anoxia injury.

[Key words] PTEN; shRNAs; Fura 2-AM; AlamarBlue; Colorimetric assay

脑缺血时大量 Glu 释放,激活 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR),导致 Ca^{2+} 内流,激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶从而产生氧自由基,损伤线粒体,既而发生坏死和凋亡[1]。NMDA 受体的调节功能主要位于 NR2B 上,NR2B 在中枢神经系统中具有广泛的分布,它在突触传递、神经元兴奋性毒性、学习记忆以及 Ca^{2+} 内流的调控等方面起重要的作用[2],因此,抑制脑缺血时 NR2B 受体活性,减少 Ca^{2+} 内流引起的神经元损伤,对缺血性脑血管病的防治具有重要意义。我们已报道过下调第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)可以减少缺氧缺糖(Oxygen-glucose deprivation,OGD)损伤大鼠海马神经元的 NR2B 酪氨酸磷酸化水平,从而达到保护神经元的目的。为此本文仍利用 OGD 培养模型,以 shRNAspten 作为干预因素,旨在从进一步探讨下调 PTEN 在 OGD 损伤后对 NR2B 受体蛋白和基因表达水平、神经元钙离子浓度及神经元活力的影响,阐明 PTEN 基因在神经元损伤中的调控作用机制。

1 材料与方法

1.1 胚胎大鼠海马神经元培养和缺氧损伤(OGD)模型[3,4]

取孕龄 18 d 的 SD 胚胎大鼠,按每孔 10^6 个细胞于 35 mm 培养皿中和 12 孔培养板中培养。培养 12 d 后神经元发育成熟,神经元轴突和树突交织成网状。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),迅速置入缺氧箱内缺氧 60 min,缺氧结束后,吸去 ECS-OGD,用含糖细胞外液(ECS)洗涤 1 次,更换维持培养基继续培养。

1.2 shRNAspten-GFP(Short hairpin RNAs)转染[4,5]和实验分组

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 条对照 shRNA 简称为 PshGFP(阴性对照序列,即无关对照的 dsRNA,它不是针对某一特定 shRNA,而是按照核苷酸比例打乱序列后设计的)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 后进行其它实验。共分 4 组:正常对照组(Normal):正常培养细胞,不做任何处理;损伤组(OGD):进行缺氧损伤;PshGFP 无关对照组:缺氧损伤并加入 PshGFP 质粒进行转染;shRNAspten 治疗组:加入 shRNAspten-GFP 质粒并转染。每组均加入等量脂质体,各取培养板 2 板,重复 5 次(5 只动物),Normal、OGD、PshGFP、shRNAspten 4 个组均为再灌注 24 h。

1.3 细胞比色分析(Colorimetric assay)法检测 NR2B 受体含量

细胞比色分析每组各取培养板 2 板,OGD 后相应时间点取出培养板,PBS 洗涤,2% 多聚甲醛固定 10 min,常规加入兔抗 NR2B(SantCruz 公司),4℃过夜;加入 HRP 2 抗,室温反应 1 h;加入 OPD(Chromagenic substrate)显色剂,避光,待显淡棕色后用 3N HCl 终止反应,进行 492 nm 比色分析。

1.4 RT-PCR 检测 NR2B 基因的 mRNA 表达

分别在相应时间点收集细胞;用 TRIzol 法抽提总 RNA,根据 ToYoBo 逆转录试剂盒说明进行操作。选用 GAPDH 基因为内参,PCR 反应体系 15 μl,包含 Taq Mix 7.5 μl,10 μ mol/L 的上下游引物各 0.3 μl,cDNA 模板 1 μl, 补灭菌 ddH_2O 至 15 μl;NR2B 和 GAPDH(NR2B-F:5'-GCTCAGCGACCTGTATGG-3', R:5'-CGTCACTGCGTTCTTTGTA-3',GAPDH-F:5'-TCAACG GCACAGTCAAGG-3',GAPDH R:5'-ACCAGTGGATGCAGG GAT-3') 反应条件:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 20 s,58 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 30 s,扩增 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min;用 Quantity One 4.6 软件对琼脂糖凝胶电泳图进行图像分析,计算目的电泳条带的光密度值与各自的 GAPDH 的比值,然后以样本/对照的比值表示基因表达水平。

1.5 胞内 Ca^{2+} 浓度检测

OGD 后相应时间点取出培养板,D-hanks 液洗涤 3 次,加不含小牛血清的 D-hanks 液 2 ml,预温至 37 ℃,加 20 μl 1 mmol/L 的 Fura 2-AM,孵育 30 min,D-hanks 洗涤 3 次,加 NB 培养基 37℃孵育 30 min,弃培养基。在激光共聚焦显微镜下,观察不同时间细胞内 Ca^{2+} 的荧光强度。荧光强度的强弱即反映胞浆游离钙的相对浓度。激光共聚焦显微镜以激发光 405 nm,接收范围 500 ~ 520 nm,扫描方式 XY,电子放大

200 倍，扫描速度 400 Hz，平均 8 次。

1.6 AlamarBlue 检测神经元存活状态

AlamarBlue 是一种监测细胞代谢活动的复合染色剂，由于细胞代谢活动，Oxidized alamarBlue 非荧光的靛青蓝转化为 Reduced alamarBlue 荧光呈粉色，存活的细胞可使其颜色变红。通过分光光度计检测颜色的改变或在荧光读板机上检测荧光强度的变化，来反应细胞增殖状态或活力，并计算细胞存活状态的相对水平。按照 Biosource 公司提供的 AlamarBlue 说明书进行操作，无菌条件下按 10%的浓度把 AlamarBlue 液加入培养基中，37℃孵育，相应时间点 MD 酶标仪 Thermo Labsystem 上 570 nm 下读取吸光度（A）值。

1.7 统计学处理

计量数据均以表示，采用 SPSS10.0 统计软件应用单因素方差分析，$P \leq 0.05$ 为相差有统计学意义。

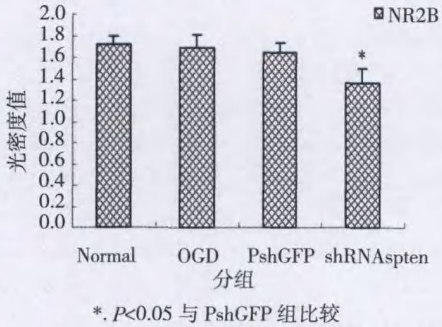
2 结 果

2.1 神经元的转染

在激光共聚焦显微镜下可见无关对照 PshGFP 组和治疗组 shRNAspten-GFP 均有绿色荧光，说明 shRNA spten 和PshGFP 质粒已成功转染到神经元中，且 PTEN 基因 mRNA 表达下降，作者另文已有报道。

2.2 神经元膜表面 NR2B 含量

光密度（OD）值表示各受体含量，OPD 细胞比色法检测结果显示，正常组与 OGD 组相比光密度值无明显差异（$P>0.05$）；与 PshGFP 组相比，shRNAspten 治疗组表达量减少（$P<0.05$）（如图 1 所示）。



*. $P<0.05$ 与 PshGFP 组比较

图 1 OPD 细胞比色分析测缺氧损伤后膜表面 NR2B 含量

2.3 NR2B 基因 mRNA 检测结果

RT-PCR 结果显示，shRNA spten 组质粒转染大鼠后，其 NR2B 基因 mRNA 表达量正常组与 OGD 和 PshGFP 组相比光密度值无明显差异（$P>0.05$）；shRNA spten 组与 PshGFP组相比，结果明显下降（$P<0.05$），说明 pshRNA spten 质粒能引起 NR2B 基因的 mRNA 水平降低（如图 2 所示）。

2.4 shRNAspten 对胞内 Ca^{2+}浓度的影响

PshGFP 无关对照组与伤后 24 h 损伤组（OGD）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（$P<0.05$）。与 PshGFP 无关对照组和 OGD 组相比，shRNA spten 治疗组胞内 Ca^{2+} 浓度显著降低（$P<0.05$）（如图 3 所示）。

2.5 AlamarBlue 活力分析

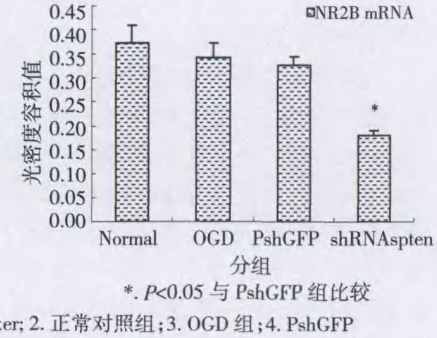
应用 AlamarBlue 活力分析检测转染 shRNA spten 后神经元的活力变化（OD 值大小反映细胞活力变化），结果显示无关对照 PshGFP 组神经元活力较正常对照组和 shRNA spten 治疗组相比均有显著下降（$P<0.05$）；PshGFP 组和 OGD 组相比尚无统计学意义。以 PshGFP 为标准（吸光度值为 100），shRNApten 治疗组与之比较，细胞活力增加 25%左右。

表 1 AlamarBlue 法检测转染后神经元的光密度值（$\bar{x} \pm s$，$n=5$）

分组	光密度值
normal	$0.934 \pm 0.095^{\#}$
OGD	0.654 ± 0.028
PshGFP	0.638 ± 0.061
shRNA spten	$0.806 \pm 0.082^{\#}$

#: $P<0.05$ 与 PshGFP 组相比较

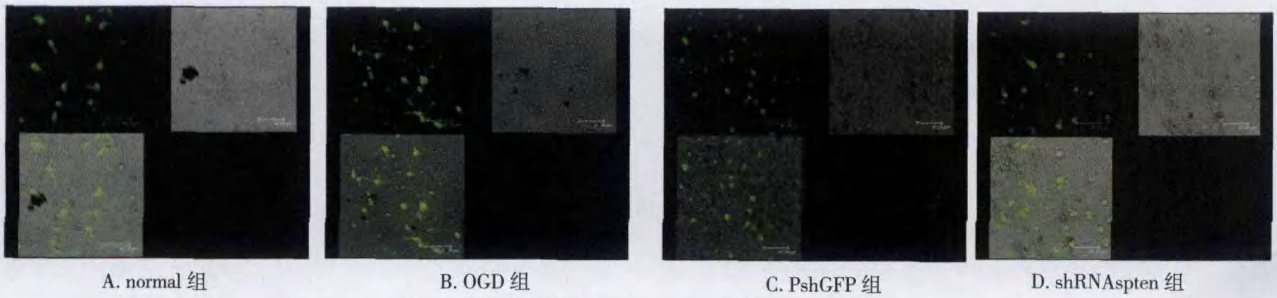




*. $P<0.05$ 与 PshGFP 组比较

Lane 1. DL2000 Marker; 2. 正常对照组；3. OGD 组；4. PshGFP 组；5. shRNAspten 组

图 2 缺氧损伤治疗前后神经元内 NR2B 基因 mRNA 的表达



A. normal 组　B. OGD 组　C. PshGFP 组　D. shRNAspten 组

图 3 缺氧损伤治疗前后神经元的钙离子荧光照片

3 讨 论

第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因 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[6]。NR2B 亚单位在 NMDA 受体的结构和功能中起到关键性的作用，NMDA 受体过度激活后，导致细胞内 Ca^{2+} 超载，最终导致神经元坏死。PTEN 作为磷酸酶，其与 NMDA 受体结合成复合物，影响了 NR2B 受体亚单位的磷酸化，进而引起受体功能改变，达到减少凋亡延长细胞生长的目的[4]。本研究通过 shRNA spten 成功转染到神经元内，使 PTEN 基因表达下降，减少了 OGD 损伤后大鼠海马神经元 NR2B 受体的 mRAN 和蛋白表达水平及胞内 Ca^{2+} 浓度，增加了神经元活力，达到了神经元保护的目的。该研究证明了下调 PTEN 基因在神经元损伤中的保护作用与 PTEN 调控 NR2B 受体的表达量相关，这与本研究目的相符。

目前对 PTEN 调节 NR2B 的准确机制尚不完全清楚，本实验采用 shRNA spten 转染 OGD 损伤神经元后，利用 RT-PCR 与细胞比色法测定 NR2B 受体的基因和蛋白表达水平，与对照组相比均有不同程度的下降。我们推测其机制可能是利用 RNAi 技术下调 PTEN 基因通过蛋白磷酸化和酪氨酸、丝/苏氨酸底物的去磷酸化，使 PKB/Akt 磷酸化，引起神经元 NR2B 受体的 mRNA 表达水平降低，继而使 NMDA 受体活性减低和 NR2B 受体功能改变，从而减少胞内 Ca^{2+} 内流，明显减轻缺血性神经元损伤程度，神经元死亡减少而活力增加，从而增加其生长活性，延长生存时间，达到神经元保护的目的，这与 Ke 等[5]等人的研究结果相一致。

细胞内游离钙是一种重要的第二信使，有着广泛而复杂的生物学活性。钙超载是多种脑性疾病所具有的共同特性，也是神经元死亡的最后共同通路[7]。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。本实验结果表明，缺糖缺氧再灌注后海马神经元内钙明显升高，pshRNA spten 能有效地阻止 Ca^{2+} 内流，降低缺氧损伤再灌注海马神经元内 $[Ca^{2+}]i$，从而减少钙离子升高所导致神经元死亡。同时，本实验还采用一种无细胞毒性的细胞活力分析试剂 AlamarBlue，在选定时间点对细胞活力和细胞增殖情况进行分析，反映缺血性神经元的损伤情况，AlamarBlue 结果表明，缺氧损伤的神经元转染重组质粒 pshRNA spten 后，细胞活力明显上升。

目前也有报道，NMDA 受体各亚单位在胞内的 C- 末端都有磷酸化作用位点，都能被 PKC 磷酸化，PKC 直接使NR2B 受体 C 端 Ser 1303，Ser 1323 磷酸化而激活 NR2B 受体，PKC 也可通过激活酪氨酸激酶（Src）信号级联反应，增强 NR2B 受体功能[8]。当然 PTEN 也可能作用于 PKC 引起 NR2B 的 Src 和 Ser 磷酸化水平改变，继而引起神经元 Ca^{2+} 改变，达到对神经元保护作用，但其具体机制不清，这也正是我们下一步的研究目标。脑缺血临床治疗问题也主要是寻找对 Glu、NMDA 受体引起 Ca^{2+} 超载的关键环节或相关靶点有调控作用的药物，根据以上特点 PTEN 有望成为新型的靶向治疗药物。

参 考 文 献

[1] 李 琳，张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志，2005，27(1)：60-62.

[2] Bliss T V.Young receptors make smart mice [J].Nature，1999，401(6748)：25-27.

[3] 陈力学，刘宝松，康格非，等. PTEN 表达下调对神经元胞内游离钙离子和神经元凋亡的研究[J].重庆医科大学学报，2006，31(4)：505-508.

[4] 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.

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

[6] Perandones C，Costanzo R V，Kowaljow V，et al. Correlation between synaptogenesis and the PTEN phosphatase expression in dendrites during postnatal brain development[J]. Brain Res Mol Brain Res，2004，128(1)：8-19.

[7] Oshikawa S，Miyake T K，Takagi N，et al. Effects of monochlorobimane on cerebral ischemia-induced damage to mitochondria[J]. Biol-Pharm-Bull，2004，27(2)：166-169.

[8] Hashimoto R，Fujimaki K，Jeong M R，et al. Neuroprotective actions of lithium[J]. Seishin Shinkeigaku Zasshi，2003，105(1)：81-86.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132