维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0505-04

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

陈力学[1],刘宝松[2],康格非[1],姜利人[2]

(1.重庆医科大学检验系临床生化室,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)

【摘 要】目的:探讨神经元缺血缺氧损伤再灌后,下调 PTEN 在阻断 Ca^{2+} 内流及凋亡调控方面的保护机制。方法:建立神经元缺糖缺氧(oxygen-glucose deprivation,OGD)损伤模型,转染 shRNAspten-GFP 质粒,用 Western blotting 检测 PTEN 水平,Fura 2-AM法测定胞内 Ca^{2+} 浓度,流式细胞术和 AO/EB 检测神经元凋亡。结果:与正常组相比 OGD 后细胞凋亡率和胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高 ($P<0.05$);与对照组相比经 shRNAspten 干预后胞内 Ca^{2+} 浓度和细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$)。结论:shRNAspten-GFP 能成功转染到神经元中,PTEN 表达下调可阻断 Ca^{2+} 内流并对缺糖缺氧诱导的细胞凋亡有拮抗作用,从而达到神经元保护的目的。

【关键词】PTEN;shRNAspten-GFP 质粒;游离钙;凋亡;神经元培养

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-14

The mechanism of PTEN down-regulation on neuron intracellular free calcium and apoptosis

CHEN Lixue, et al

(The Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To investigate the regulation of PTEN on apoptosis and the active roles in blocking Ca^{2+} influx and neuroprotection. *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. Intracellular free calcium concentration were measured with Fura-2 AM fluorescent indicator, the expression of PTEN were analyzed by immunoblotting(blot) and neuron apoptosis were detected by AO/EB and Flow Cytometry. *Results:* Apoptosis rate and calcium concentration after OGD was significantly higher than that of normal group ($P<0.05$). But intracellular free calcium concentration and apoptosis with shRNAspten-GFP treatment after OGD was significantly lower than that in OGD group and PshGFP group ($P<0.05$). *Conclusion:* shRNAspten-GFP plasmid can been expressed successfully in cultured neurons. PTEN down-regulation could effectively suppress apoptosis occurrence induced by OGD and the increase of intracellular free calcium concentration, and then protect neuron from anoxia injury.

【Key words】PTEN;shRNAs;Ca^{2+};Apoptosis;Neuron culture

近年来发现脑缺血再灌注可以诱导神经元凋亡,神经元凋亡参与了脑缺血性损伤,但是脑缺血/再灌注诱导神经元凋亡的机理尚不清楚,这给神经元凋亡的防治带来了极大的困难。以往的研究发现,脑缺血/再灌注诱导神经元钙超载在神经元缺血性损伤中起重要的作用,钙超载是否参与脑缺血/再灌注诱导的神经元凋亡值得进一步研究。PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten)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],同时它在细胞凋亡调控方面发挥着重要作用,为此我们利用体外培养大鼠海马神经元模拟脑缺血/再灌注损伤模型即 OGD 模型,以 shRNAspten 作为干预因素旨在进一步探讨其在神经元损伤中的保护机制,为临床缺血性脑血管病的防治和新药的开发提供理论依据。

作者介绍:陈力学(1973-),男,博士研究生,主要研究方向:中枢神经系统继发性损害发生机制研究。

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目(8107)。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 胚胎大鼠海马神经元培养[5]

取孕龄 18 天的 SD 胚胎大鼠(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供，分离海马神经元(活细胞计数应>70%)，按每孔 10^6 个细胞培养。接种培养基的主要成份为：胎鼠神经元培养基(Neurobasal Medium，2% B-27，0.5 μmol/L L-谷胺酰胺，25 μmol/L 谷氨酸，0.5% FBS)。3 天后更换为无血清维持培养基，以后每 3 天更换 1 次。培养 12 天后神经元发育成熟，神经元轴突和树突交织成网状。

1.2 shRNAspten-GFP(short hairpin RNAs)转染[5]

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 条无关对照 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 后进行其它实验。

1.3 缺氧损伤(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)，主要成分[mmol/L：NaCl 116，KCl 5.4，$MgSO_4$ 0.8，NaH_2PO_4 1.0，$CaCl_2$ 1.8，$NaHCO_3$ 26，Sucrose 33]，迅速置入缺氧箱内缺氧 60 min，缺氧箱内温度 37℃，气体成分含量分别为：(85% N_2，10% H_2，5% CO_2)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[5]。

1.4 实验分组

共分 4 组：正常组 (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 (分再灌 24、48、72 h) 治疗组：加入 shRNAspten-GFP 质粒进行转染。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)。

1.5 检测指标

1.5.1 Western blotting 检测 PTEN 表达水平

收集细胞，PBS 洗涤，加少量裂解液，冰浴裂解，破碎，800g 4 ℃离心 5 min，取上清，12000 g 4 ℃离心 15 min，取上清液，定量后置于 -70 ℃冰箱待用。参考相关文献，等量的样品蛋白，经 10 % SDS-PAGE 分离后，转膜，加入用封闭液稀释的 PTEN 一抗，洗涤，加入二抗，洗涤，用 ECL 发光试剂 (Sant cruz 公司)。所得胶片扫描后用图像软件处理。

1.5.2 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 3 次，加 D-hanks 液 2 ml，再加入 10 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，0.25%胰酶消化，收集细胞，荧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：$[Ca^{2+}]=Kd\times(F-Fmin)/(Fmax-F)$，其中 Kd =224 nmol/L，Fmin 为加入 EGTA (至终浓度 8 μmol/L) 时 340 nm 的荧光强度值；Fmax 为加入 0.2% Triton 时 340 nm 荧光强度值，结果以 nmol/L 计。

1.5.3 流式细胞仪检测

将收集的沉淀细胞用 250 μl 稀释的缓冲液重悬细胞，调节其浓度为 1×10^6/ml。取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl (20 μg/ml) 的 PI 溶液。混匀后于室温避光孵育 15 min。在反应管中加 400 μl PBS，流式细胞仪(FACS)分析。

1.5.4 吖啶橙 / 溴乙啶(AO/EB)荧光比色

在相应时间点取出培养板 0.25%胰蛋白酶消化，血清终止，加入工脑脊液 200 μl 混匀，4 ℃ 1000 g 离心 5 min，取沉淀加 50 μl AO/EB 染液，混匀，反应 1 min，ACSF 洗涤，离心，取沉淀用 ACSF 稀释至 200 μl，荧光读板机 (AO 激发波长 420～485 nm，发射波长 520 nm；EB 激发波长 530 nm，发射波长 590 nm) 上读取测定管和空白对照 OD 值。

1.6 统计学处理

计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件应用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 神经元的转染

在激光共聚焦显微镜下可见无关对照 PshGFP 组和治疗组 shRNAspten-GFP 均有绿色荧光，转染效率达 16%左右(图 1 所示)，说明 shRNApten 质粒已成功地转染到神经元中。

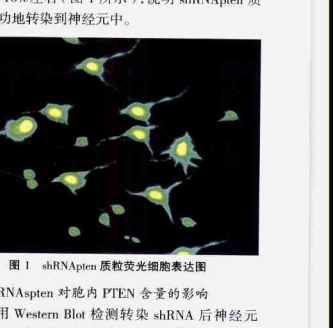


图 1 shRNApten 质粒荧光细胞表达图

2.2 shRNAspten 对胞内 PTEN 含量的影响

应用 Western Blot 检测转染 shRNA 后神经元中 PTEN 蛋白的表达，结果显示，正常对照(脂质体) 组和无关对照 PshGFP 组相比 PTEN 蛋白的表达差异不显著($P>0.05$)；与正常组相比转染重组质粒 pshRNA-pten 后出现 PTEN 蛋白表达显著受抑($P<0.05$)。结果提示，转染 shRNAspten-GFP 后下调 PTEN 是成功的(图 2 所示)。

2.3 shRNAspten 对胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

PshGFP 无关对照组、损伤组 (OGD) 及

维普资讯 http://www.cqvip.com

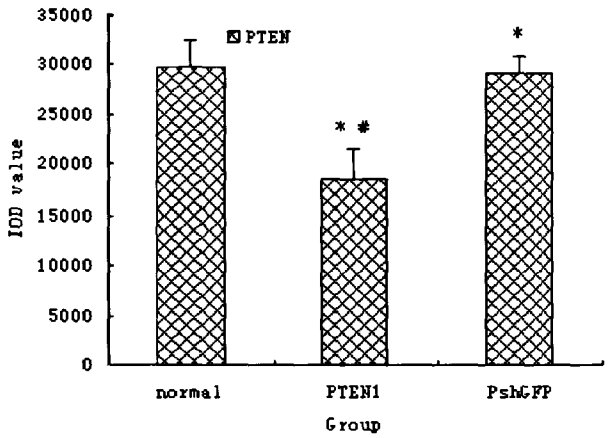


图 2　Western blotting 检测 PTEN 表达水平

*：$P<0.05$ 与 normal 组比较

shRNApten组，细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于正常组（$P<0.05$），但是 shRNApten 组细胞内钙离子增高的幅度比 PshGFP 组和 OGD 组低 30%左右（图 3 所示）。

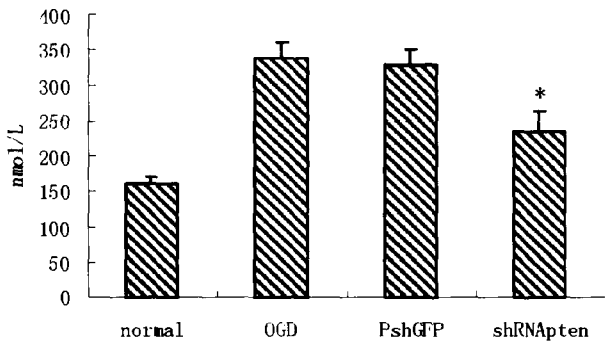


图 3　海马神经元胞浆游离钙浓度变化

*: $P<0.05$ 与 无关对照 PshGFP 比较

2.4　流式细胞术凋亡细胞检测

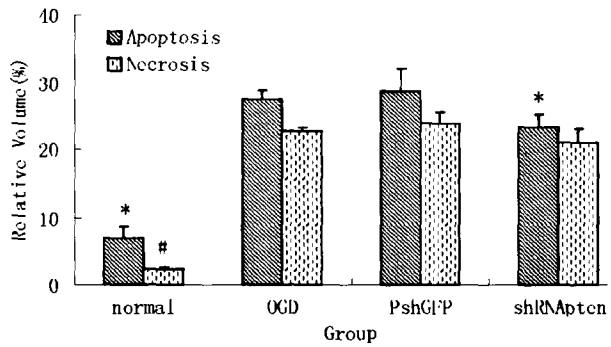


图 4　流式细胞术检测神经元坏死和凋亡率变化

*: $P<0.05$ 与 无关对照 PshGFP 凋亡率相比

#: $P<0.05$ 与 无关对照 PshGFP 坏死率相比

结果显示，对于正常培养大鼠海马神经元，亦可见到少量的坏死和凋亡神经元。模拟缺血 1 h 再恢复糖和氧供应后，与 PshGFP 无关对照组相比 shRNApten治疗组神经元坏死率下降但尚无统计学差异（$P>0.05$），凋亡神经元百分率明显下降（$P<0.05$）。PshGFP 与 OGD 组相比，凋亡率差异无显著性（$P>0.05$）。

2.5　AO/EB 检测细胞凋亡

采用 AO/EB 染色方法可观察各取材部位凋亡细胞总量的变化，AO 能透过细胞膜而嵌入 DNA，使之呈现绿色；EB 仅能透过破损的细胞膜而嵌入 DNA 使之呈橘红色，凋亡的细胞由于染色质高度浓缩使其细胞核着色均匀一致，可以通过荧光强度来反应凋亡细胞的总量变化。结果显示，对于正常培养大鼠海马神经元，亦有少量的细胞凋亡，模拟缺血 1 h 再恢复糖和氧供应后，与 PshGFP 相比 shRNApten 治疗组凋亡神经元数量明显下降（$P<0.05$）。

表 1　AO/EB 荧光比色法检测神经元凋亡情况($\bar{x}\pm s$)

group	fluorescence intensity
normal	1733 ± 13.43*
OGD	3214 ± 20.98
PshGFP	3236 ± 32.35
24 h	2766 ± 56.82*
48 h	2550 ± 134.59*
72 h	2468 ± 74.01*

*: $P<0.05$ 与 无关对照 PshGFP 比较

3　讨　论

大量研究表明，细胞内 Ca^{2+} 超载是引起神经元延迟性损害的重要原因，具体的机制目前尚不清楚，但多数学者认为 NMDA 受体过度激活后，Ca^{2+} 通过 NMDA 受体通道、电压门控性 Ca^{2+} 通道等途径大量内流，导致细胞内 Ca^{2+} 超载，最终引起神经元肿胀坏死[4]。本研究发现，体外培养大鼠海马神经元缺血再灌注损伤后，细胞内 Ca^{2+} 荧光强度增高，提示缺氧损伤后胞内 Ca^{2+} 明显增加，经 shRNAspten 治疗后胞内 Ca^{2+} 浓度下降，说明下调 PTEN 对神经元损伤有保护作用。

细胞凋亡是真核细胞常见的死亡形式，是机体为维持自身稳态而进行的生理性自杀过程。凋亡细胞在胞核和胞质结构上常出现特征性改变，如质膜的快速突起发泡和钙依赖性核酸内切酶激活引起的 DNA 断裂以及细胞核解体、凋亡小体形成等[5,6]。细胞凋亡的发生一方面与基因表达有关；另一方面则与 Ca^{2+}、自由基、兴奋性氨基酸等外在环境因素

维普资讯 http://www.cqvip.com

作用有关,细胞凋亡不仅存在于缺血性神经元损伤过程之中,而且在迟发性神经元死亡和继发性损害发生过程中占重要地位[6]。研究表明凋亡的神经元主要存在于梗死的内边缘,即缺血半影区,凋亡程度决定了缺血梗死范围的大小,这迫使人们从防治凋亡的角度去探索缺血性脑血管病的治疗,减少神经元凋亡相关事件的发生是保护神经元缺血性损伤的一种机制[7]。本实验采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记 Annexin V,同时结合 PI 拒染法进行凋亡细胞双染后用流式细胞仪检测,结果显示,体外培养大鼠海马神经元缺氧再灌后,神经元的凋亡率与坏死率均增加,而且以凋亡率增加为著,从而进一步验证了前人关于缺氧损伤所致延迟性神经元损伤以凋亡为主的观点,但经过 PTEN 治疗后神经元坏死率和凋亡率均下降;AO/EB 染色方法可观察凋亡细胞总量的变化,其结果与流式测得的结果吻合,说明 PTEN 下调可以抑制神经元的凋亡,从而延长了它的生存时间。

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,从而抑制细胞生长促进凋亡。PTEN 也可通过 Fas 活化 Caspase-8,增加细胞对辐射及 Fas-FasL 诱导的凋亡的敏感性,并引起细胞的线粒体通透性改变,这一作用可能与 PI3K 途径有关[8]。因此当下调 PTEN 就可能会激活 PI3K/Akt 信号通路,达到减少凋亡延长细胞生长时间的目的。本研究通过激光共聚焦显微镜观察到 shRNApten 成功转染到神经元内,经过免疫印迹检测发现转染后 PTEN 确有下降。至于下调 PTEN 阻断 Ca^{2+} 内流的机制,我们推测可能是通过其减少 NMDA 受体活性,阻断 Ca^{2+} 内流,导致与凋亡相关的酶活性降低,达到神经元保护的目的;另外一条途径是 PTEN 可能是通过 Cdk5 而影响细胞凋亡,达到保护的目的,但其具体机制都有待于深入研究。

参 考 文 献

[1] Choi JS, Park HJ, Kim HY, 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] Ke Ning,Lin Pei,Mingxia Liao,et al. Dual neuroprotective signaling mediated hy downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN[J]. J Neurosci, 2004;24(16):4052-4060.

[4] 侯筱宇,张光毅. NMDA 受体信号复合体中蛋白质的相互作用[J].生命科学,2003;15(5):274-278.

[5] Kawaguchi M, Drummond JC,Cole DJ, et al. Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia [J]. Anesth Analg ,2004;98(3):798-805.

[6] Yin D, Zhou C,Kusaka I, et al. Inhibition of Apoptosis hy Hyperharic Oxygen in a Rat Focal Ce-rebral Ischemic Model [J]. J Cereh Blood Flow Metah, 2003;23(7):855-864.

[7] Hoehn B, Yenari MA, Sapolsky RM , et al. Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke[J].Stroke, 2003;34(10): 2489-2494.

[8] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001;114(13): 2375-2382.

(上接第 501 页)

[2] King MC, Raposo G, Lemmon MA,et al. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB[J].Proc Natl Acad Sci USA,2004;101(24):8957-8962.

[3] Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection:roles of MxA,OAS-1 and PKR[J].Genes Immun.2003;4(6):411-419.

[4] Haller O,Kochs G.Interferon-induced Mx proteins:dynamin-like GTPases with antiviral activity[J] .Traffic,2002;3(10):710-714.

[5] Engelhardt OG, Ullrich E,Kochs G,et al. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear hodies [J].Exp Cell Res,2001;271 (2):286-295.

[6] Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C,et al. Inhibition of hepatitis B virus replication hy the interferon-inducihle MxA protein [J].J Virol,2001; 75(6):2684-2691.

[7] Lee SH, Vidal SM. Functional diversity of Mx proteins:variations on a theme of host resistance to infection[J].Genome Res.2002;12(4):527-530.

[8] Kirk CJ, Mule JJ. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines[J]. Human Gene Therapy, 2000;11(6):797-806.

[9] He TC, Zhou S,Cosla LT,et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95 (5): 2509-2514.