

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.001

下调 PTEN 基因对慢性偏头痛大鼠 NR2B 亚基酪氨酸磷酸化和一氧化氮的影响*

李王文¹, 秦光成¹, 陈力学^{1△}, 谢景梅¹, 吴白雪¹, 周冀英²

(重庆医科大学附属第一医院:1. 实验研究中心;2. 神经内科, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 利用 RNAi 重组腺病毒下调第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(PTEN)的表达,探讨 PTEN 基因对慢性偏头痛大鼠三叉神经脊束核尾核(TNC)内 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基酪氨酸磷酸化(NR2B-pTyr)蛋白表达水平和一氧化氮(NO)含量的影响。**方法** 将 SD 雄性大鼠分为对照组、对照干预组、模型组和模型干预组。硬脑膜滴注炎性汤(IS)建立慢性偏头痛大鼠模型,TNC 注射 AdR-siPTEN,7 d 后观察大鼠行为学改变,检测大鼠 TNC 内 PTEN、NR2B-pTyr 和 NO 含量。**结果** AdR-siPTEN 可下调慢性偏头痛大鼠模型 TNC 中 PTEN 的表达;与模型组比较,IS 干预慢性偏头痛大鼠的行为学症状明显缓解,大鼠的 TNC 内 NR2B-pTyr 表达水平及 NO 水平明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PTEN 参与调节慢性偏头痛的病理过程,下调 PTEN 基因可缓解 IS 诱导的慢性偏头痛大鼠的疼痛行为学,其机制可能与下调 PTEN 引起 NR2B-pTyr 表达量及 NO 水平降低有关。

[关键词] 慢性偏头痛;第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因;N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基;磷酸化;一氧化氮

[中图分类号] R747.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)35-4897-04

The effects of PTEN gene down-regulation on the NR2B-pTyr expression and NO in rat model of chronic migraine*

Li Wangwen¹, Qin Guangcheng¹, Chen Lixue^{1△}, Xie Jingmei¹, Wu Baixue¹, Zhou Jiyong²

(1. Laboratory Research Center, 2. Department of Neurology, the First Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To employ the RNAi recombinant adenovirus to knock down the expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten(PTEN) gene, and to explore the effects of PTEN gene on the expression of tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit and nitric oxide(NO) in the trigeminal nucleus caudalis(TNC) of rats with inflammatory soup-induced chronic migraine. **Methods** SD rats were divided into the control groups(with or without intervention) and model groups(with or without intervention). The chronic migraine rat model was established by pumping inflammation soup(IS) to the rat dura mater, and injected AdR-siPTEN into the TNC of rat after the last time pumping IS. The behaviors change of migraine rats was observed, and the expression of PTEN, NR2B-pTyr and NO in TNC of migraine rats was detected 7 days after injecting AdR-siPTEN. **Results** The expression of PTEN gene in TNC of rate model of chronic migraine was down-regulated by the localized injection of AdR-siPTEN. Compared with the model group, behavioral symptoms of IS-induced rats were obviously relieved, and the expression of PTEN, NR2B-pTyr and NO production in TNC of IS-induced rats was significantly decreased, there was statistically significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** PTEN may play an important role in the pathological mechanism of chronic migraine. Down-regulating PTEN gene expression can relieve IS-induced pain-related behaviors of rats with chronic migraine, which may be related to the decrease of NR2B-pTyr expression and NO production induced by down-regulation of PTEN.

[Key words] chronic migraine; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; NR2B; phosphorylation; nitric oxide

偏头痛(migraine)是一种反复发作的、一侧或双侧搏动性的剧烈头痛,发作时常伴随恶心、呕吐、畏光和畏声等症状^[1]。根据国际头痛协会(IHS)国际头痛疾病分类第 2 版(ICHD-II)的标准,偏头痛反复发作(每个月不少于 15 d),持续 3 个月以上,无药物滥用,即为慢性偏头痛(chronic migraine, CM)。CM 已被 WHO 列为四大最严重的慢性功能障碍性疾病之一,其发病机制尚不明确,目前多认为神经源性炎症引起的中枢致敏与 CM 的发病相关。神经源性炎症所致的神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)的异常激活是产生疼痛及痛觉维持的重

要机制,NMDAR 的性质在很大程度上由其亚单位 NR2B 所决定,其中 NR2B 酪氨酸磷酸化(NMDAR2B tyrosine phosphorylation, NR2B-pTyr)水平升高是诱导和维持慢性疼痛炎症性痛觉过敏的主要原因之一^[2]。

RNAi 重组腺病毒下调第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)是一个近年来新发现的,同时具有脂质和蛋白质双重磷酸酶活性的抑癌基因,其广泛分布于中枢神经系统,不仅对神经系统的发育及正常功能的维持具有重要作

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81500957;81671093);重庆市科委基础与前沿研究计划项目(cstc2013jjB10009);重庆市渝中区科技计划项目(20160107)。 作者简介:李王文(1988—),住院医师,硕士,主要从事偏头痛发病机制研究。 △ 通讯作者, Tel:023-89012105; E-mail:chenlixue@163.com。

用,同时与脑缺血、癫痫、药物成瘾性等神经精神障碍疾病的发生密切相关。已有研究报道,下调 PTEN 基因可降低 NR2B 的表达和一氧化氮(NO)的水平,缓解偏头痛的发作^[3]。为此本文通过 AdR-siPTEN 重组腺病毒下调 PTEN 基因,观察炎性汤诱导的 CM 大鼠行为学的变化,同时探讨 PTEN 是否可通过调节 NR2B-pTyr 影响 NO 的合成,继而抑制 CM 的发生。

1 材料与与方法

1.1 实验动物的分组及大鼠 CM 模型的建立

清洁级 Sprague Dawley (SD) 成年雄性大鼠,体质量(210±30)g,各项实验均每组 6 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。参见 Oshinsky 等^[4]和 Stucky 等^[5]的方法稍作改动,建立大鼠 CM 模型。将大鼠头部建立炎性汤[IS,包含 1 mmol/L 组织胺、1 mmol/L 5-羟色胺、1 mmol/L 缓激肽、0.1 mmol/L 前列腺素 E2 的磷酸盐缓冲液(PBS),pH 7.4,美国 Sigma 公司]诱导窗,植入微量给药系统 1 周后,选择伤口未感染的 24 只实验大鼠入实验组,将其分为以下 4 组:对照组(Sham 组)、对照干预组(Sham+AdR-siPTEN 组)、模型组(IS 组)、模型干预组(IS+AdR-siPTEN 组),每组 6 只。实验大鼠硬脑膜下每次泵入炎性汤 10 μL,3 次/周,连续 3 周,建立 CM 大鼠模型,对照组大鼠硬脑膜下泵入等体积生理盐水。造模结束后,PTEN 干预组立即定位三叉神经脊束核尾核(TNC,在前囟后 14.6 mm、中线旁开 2.5 mm、深 9.0 mm),用微量注射器缓慢注射重组腺病毒 AdR-siPTEN 5 μL。1 周后取大鼠 TNC,做连续冰冻切片,厚 15 μm,在荧光显微镜下观察 TNC 中荧光蛋白的表达。本研究动物实验符合本院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 方法

1.2.1 实验大鼠行为学观察

最后一次泵入 IS 或生理盐水后,用大鼠自主活动行为分析仪(淮北正华公司)观察大鼠挠头、咬尾、爬笼、往返运动的次数总和(每个症状出现 1 次计 1 分)等行为学症状 90 min。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 PTEN 基因 mRNA 表达

各实验组大鼠在 3.5% 水合氯醛麻醉下,快速断头分离出 TNC,立即放入液氮中速冻。用 Trizol 法提取总 RNA,根据日本 Toyobo 逆转录试剂盒说明进行操作。PCR 总反应体系 25 μL。引物序列:PTEN(362 bp)上游序列:5'-TTG AAG ACC ATA ACC CAC C-3',下游序列:5'-AGT TCC GCC ACT GAA CAT-3';三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,470 bp)上游序列:5'-TCA ACG GCA CAG TCA AGG-3',下游序列:5'-ACC AGT GGA TGC AGG GAT-3'。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 20 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,扩增 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min,以 GAPDH 为内参照。将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,用 Quantity One 软件进行电泳条带吸光度(A)值分析,以 PTEN/GAPDH 积分吸光度值的比值表示基因表达水平。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白质的表达

取各实验组大鼠 TNC 组织块,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,按 1:500 分别加入兔抗 PTEN 抗体、兔抗 NR2B-pTyr 抗体,4 °C 孵育过夜。次日吐温 20 的 Tris 缓冲生理盐水(TBST)洗膜后再按 1:500 加入羊抗兔二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜。化学发光试剂于暗室自显影,凝胶成像系统测定积分吸光度值分析结果。以 β-

actin 蛋白作为内参照。

1.2.4 NO 水平的测定

取各组大鼠 TNC 组织块,称重后用眼科剪尽快剪碎,加入预冷的匀浆介质[pH 7.4,0.01 mol/L Tris-HCl,0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-Na₂),0.01 mol/L 蔗糖,0.8% 氯化钠溶液]匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,吸取上清液 0.5 mL,根据 NO 测定试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)测定组织 NO 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件完成统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AdR-siPTEN 在大鼠 TNC 的转染效果

AdR-siPTEN 转染的大鼠 TNC 有红色荧光蛋白表达(图 1),表明 PTEN 基因腺病毒转染成功。

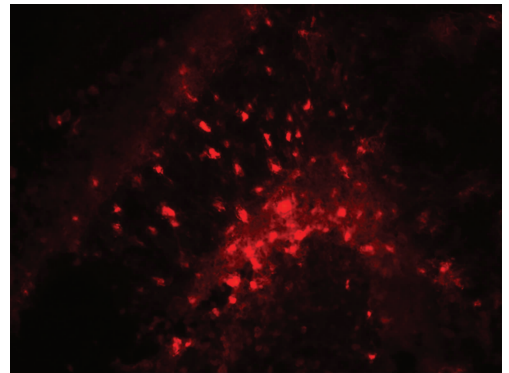
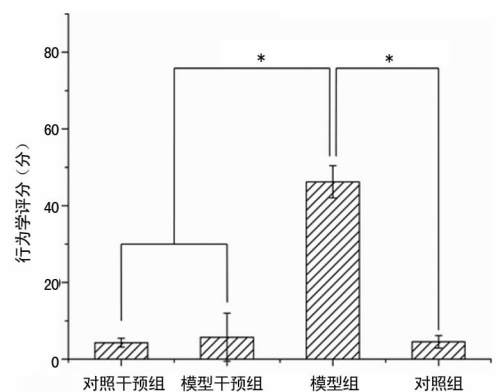


图 1 AdR-siPTEN 转染的 TNC 显示红色荧光(×200)

2.2 大鼠行为学的变化

第 9 次注射 IS 的模型组大鼠出现前肢频繁挠头、双耳发红、爬笼次数增多、往返运动等不适症状,表明造模成功。模型组与对照组、模型干预组、对照干预组的行为学评分比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);对照组、模型干预组与对照干预组的行为学评分比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。



*: $P < 0.05$,与模型组比较; $n = 6$ 。

图 2 各组实验大鼠行为学评分

2.3 大鼠 TNC 中 PTEN mRNA 检测结果

RT-PCR 结果显示,对照组与对照干预组、模型干预组间 PTEN 基因 mRNA 表达水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型组与对照干预组、模型干预组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。表明重组腺病毒 AdR-siPTEN 能有效抑制 TNC 中 PTEN 基因 mRNA 表达。

2.4 大鼠 TNC 中 PTEN 和 NR2B-pTyr 蛋白表达

Western blotting 结果显示,对照组 PTEN 基因蛋白表达水平高于对照

干预组与模型干预组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型组 PTEN 基因蛋白表达水平高于对照干预组与模型干预组,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),见图 4;表明重组腺病毒 AdR-siPTEN 能有效抑制 TNC 中 PTEN 蛋白表达。与模型组比较,模型干预组 NR2B-pTyr 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型干预组与对照组 NR2B-pTyr 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组与对照组比较,NR2B-pTyr 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。表明 IS 诱导的 CM 大鼠 TNC 中 NR2B-pTyr 蛋白表达水平明显增高,而重组腺病毒 AdR-siPTEN 能明显抑制 TNC 中 NR2B-pTyr 蛋白表达。

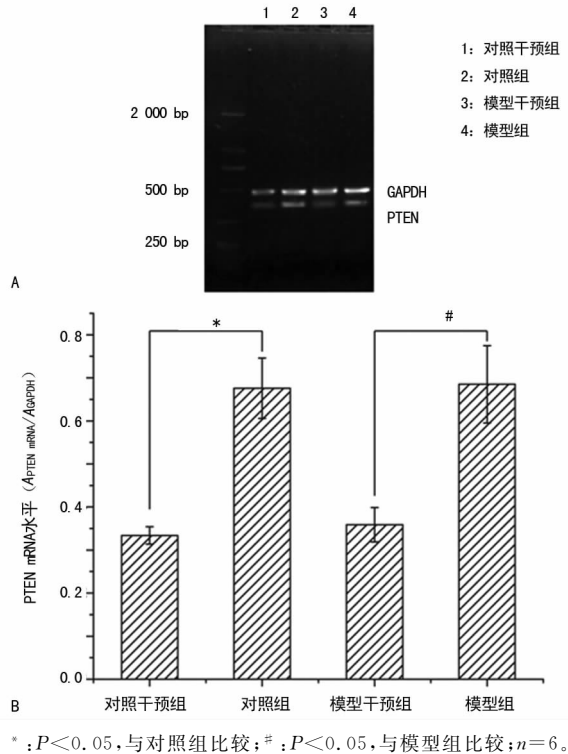


图 3 各组大鼠 TNC 内 PTEN 基因 mRNA 的表达

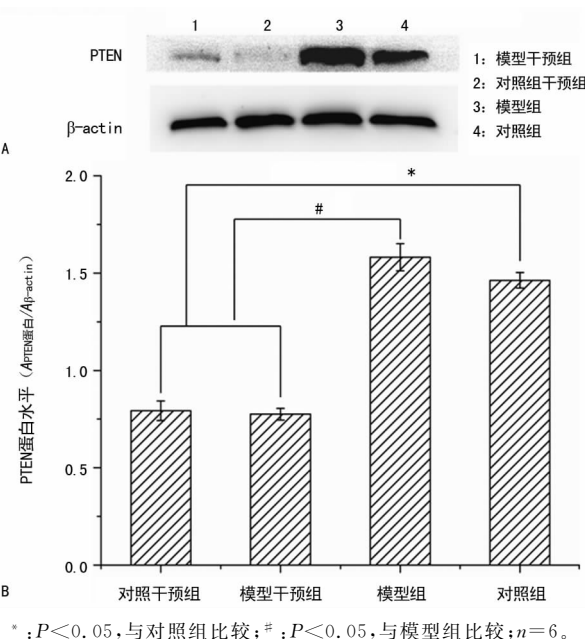


图 4 各组大鼠 TNC 内 PTEN 蛋白表达

2.5 大鼠 TNC 中 NO 水平比较 与模型组比较,模型干预组 NO 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型干预组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 6。表明 IS 诱导的 CM 大鼠模型 TNC 中 NO 水平明显增高,而重组腺病毒 AdR-siPTEN 能明显降低 TNC 中 NO 水平。

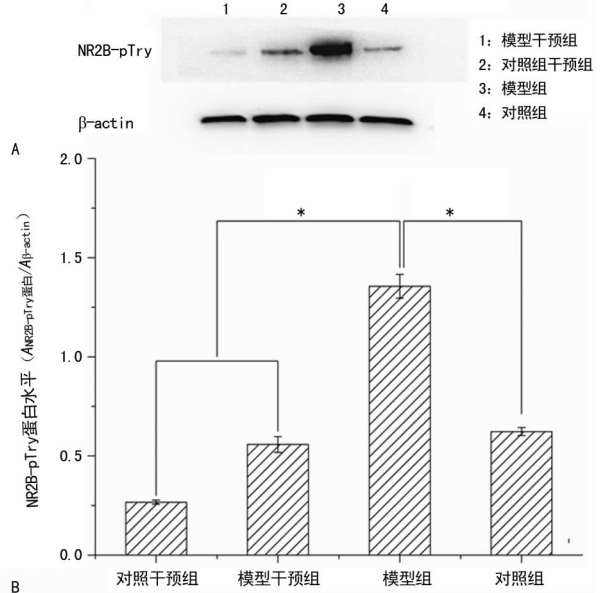


图 5 各组大鼠 TNC 内 NR2B-pTyr 蛋白表达

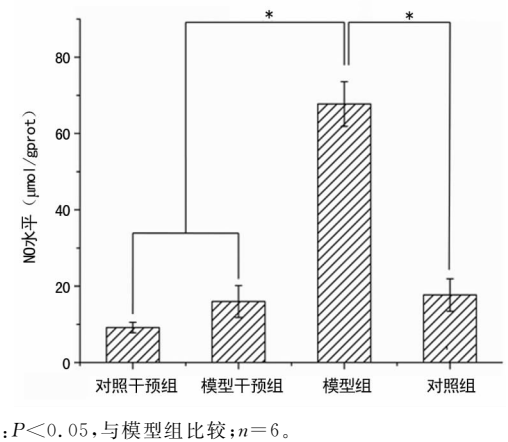


图 6 各组大鼠 TNC 内 NO 水平比较

3 讨论

本研究结果发现,利用 AdR-siPTEN 重组腺病毒,可以使 CM 模型大鼠咬尾、挠头次数和爬笼等行为学症状明显缓解,降低 TNC 中 PTEN 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。同时下调 PTEN 基因后,大鼠 TNC 的 NR2B-pTyr 和 NO 水平也显著降低。上述结果表明,PTEN 基因可能通过降低 NR2B-pTyr 和 NO 水平,参与 CM 的发作。

CM 的发病机制尚不完全清楚,但目前三叉神经系统痛觉中枢敏化在 CM 发病的病理生理机制中占主导地位,而 TNC 是三叉神经系统痛觉中枢敏化中最重要的解剖结构^[6]。NR2B 是 NMDAR 的一个基本调节亚基,在学习、记忆、痛觉传导及中枢敏化中发挥重要作用,许多神经系统疾病与 NR2B 也有密切关系^[7],其酪氨酸磷酸化是 NR2B 激活的一个重要机制^[8]。Kato 等^[9]发现,NR2B-pTyr 在中枢痛觉敏化的形成和维持,以及兴奋性突触传递和中枢神经系统神经元兴奋中毒中发挥关

键作用。有研究证实,在 IS 诱发的 CM 大鼠 TNC 中, NR2B-pTyr 表达水平较对照组大鼠明显升高。而 NR2B-pTyr 表达水平的升高,会使钙离子(Ca^{2+})渗透性增加,当神经元中 Ca^{2+} 浓度达到一定水平,并与钙调蛋白相结合,就会激活神经元的一氧化氮合酶(NOS),最终引起中枢痛觉过敏和头痛。另有研究表明, NR2B-pTyr 在三叉神经系统的中枢敏化和痛觉传递中发挥重要作用。有研究证实,随着 NR2B-pTyr 在 TNC 中表达水平的升高,CM 大鼠的痛阈值明显降低,且随着 AdR-siPTEN 抑制 PTEN 基因的表达,继而抑制 NR2B-pTyr 在 TNC 中的表达,模型组大鼠的痛阈值恢复至与对照组相近的水平^[10]。这些结果表明,CM 大鼠的痛阈值是降低的,而痛阈值的降低与 NR2B-pTyr 表达升高相关。

NO 是目前公认的在偏头痛发病机制中起关键作用的分子,它可以立即扩张大脑动脉引起非特异性头痛,又可以作为信号分子传导痛觉,参与中枢敏化的形成,引起延迟的典型偏头痛样头痛^[11]。研究发现,偏头痛大鼠模型中 TNC 神经元型一氧化氮合酶(nNOS)活性增强,一方面可以导致内源性 NO 的释放大量增加,增加的 NO 参与 TNC 中枢敏化,引起痛觉超敏;另一方面它可以通过增加三叉神经节神经元中枢突触释放的降钙素基因相关肽(CGRP),增加易化痛觉传递,从而形成偏头痛^[12-14]。还有研究表明,在偏头痛患者头痛发作期,其血清 NO 水平明显升高,而在其头痛间歇期,NO 水平降低,但是仍高于正常水平^[15]。与上述研究类似,本研究结果表明,在 CM 大鼠的 TNC 中,NO 水平明显升高,导致 TNC 中枢敏化,从而导致偏头痛大鼠模型的痛阈值降低。

PTEN 是定位在第 10 号染色体的抑癌基因,它不仅可以抑制细胞增殖和通过 DNA 损伤使细胞凋亡来抑制肿瘤形成,还在中枢神经系统相关疾病中发挥重要作用。研究报告,下调 PTEN 基因可降低 NR2B 和 NR2B-pTyr 的表达,阻断 Ca^{2+} 内流,增加细胞活力,从而保护神经元损伤;且下调 PTEN 基因可引起环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)表达增加,从而增强全脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力^[15-17]。本研究表明,通过 AdR-siPTEN 转染 TNC,可以使 CM 大鼠痛阈值升高,以及行为学恢复到与对照组基本一致的水平,同时,也可使 TNC 内 NR2B-pTyr 和 NO 水平降低。提示 PTEN 可能通过 PTEN/NR2B-pTyr/NO 信号通路在 CM 的发病中发挥重要作用,而 PTEN 影响 TNCNR2B-pTyr 水平的分子机制,以及其如何通过 PTEN/NR2B-pTyr/NO 信号通路发挥作用,目前尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1] Mehrotra S, Gupta S, Chan KY, et al. Current and prospective pharmacological targets in relation to antimigraine action[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2008, 378(4): 371-394.

[2] Grosshans DR, Browning MD. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor[J]. *J Neurochem*, 2001, 76(3): 737-744.

[3] 冉丽, 申崇标, 陈力学, 等. 下调 PTEN 基因对偏头痛大鼠三叉神经节 NMDAR1 和一氧化氮的影响[J]. *中国疼痛*

医学杂志, 2012, 18(3): 163-168.

- [4] Oshinsky ML, Gomonchareonsiri S. Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache[J]. *Headache*, 2007, 47(7): 1026-1036.
- [5] Stucky NL, Gregory E, Winter MK, et al. Sex differences in behavior and expression of CGRP-related genes in a rodent model of chronic migraine[J]. *Headache*, 2011, 51(5): 674-692.
- [6] Panerai AE. Is migraine a disorder of the central nervous system? [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(Suppl 1): S33-35.
- [7] Zhou Q, Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases[J]. *Neuropharmacology*, 2013(74): 69-75.
- [8] Zhang J, Zhang W, Sun Y, et al. Activation of GRs-Akt-nNOS-NR2B signaling pathway by second dose GR agonist contributes to exacerbated hyperalgesia in a rat model of radicular pain[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(6): 4053-4061.
- [9] Kato H, Narita M, Miyatake M, et al. Role of neuronal NR2B subunit-containing NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx and astrocytic activation in cultured mouse cortical neurons and astrocytes[J]. *Synapse*, 2006, 59(1): 10-17.
- [10] 李文文. PTEN 介导 NR2B-Tyr 信号通路参与大鼠偏头痛慢性化的维持机制[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [11] Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, et al. Drugs targeting nitric oxide synthase for migraine treatment[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2014, 23(8): 1141-1148.
- [12] Bates EA, Nikai T, Brennan KC, et al. Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice[J]. *Cephalalgia*, 2010, 30(2): 170-178.
- [13] Markovics A, Kormos V, Gaszner B, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 633-644.
- [14] Storer RJ, Suprongsinchai W, Srikiatkachorn A. Animal models of chronic migraine[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2015, 19(1): 467.
- [15] Uzar E, Evliyaoglu O, Toprak G, et al. Increased asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in patients with migraine [J]. *J Headache Pain*, 2011, 12(2): 239-243.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 陈力学, 熊新, 桂蓓, 等. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(6): 673-676.