

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.006

AKAP5 在电刺激大鼠三叉神经核尾侧复合体的表达 *

姜 磊 于生元[△] 董 钊 王晓琳 刘洁晓

(解放军总医院神经内科 北京 100853)

摘要 目的:利用电刺激大鼠的偏头痛动物模型,研究与偏头痛病理生理关系密切的 AKAP5 基因在动物模型中的表达。**方法:**体重为 250 克左右 SD 大鼠 27 只,随机分为 a 对照组(n=4)、b 电刺激 30 分钟组(n=6)、c 电刺激 60 分钟组(n=6)、d 电刺激 120 分钟组(n=5)和 e 吗啡干预 + 电刺激 120 分钟组(n=6),共 5 组。对照组不予刺激,其余各组电刺激不同时间,各组结束后立即断头取脑,取出延髓及上颈段(至颈 2),利用 western-blot 技术对 AKAP5 在三叉神经核尾侧复合体中的表达进行研究。**结果:**AKAP5 在大鼠三叉神经核尾侧复合体中有表达,各组 AKAP5 积分密度比值分别为 2.804,0.913,1.383,0.634,1.030,组间表达无显著差异($P=0.9921>0.05$)。**结论:**AKAP5 在电刺激与对照组中的表达无显著差异,吗啡对 AKAP5 的表达无显著影响。

关键词:动物模型;偏头痛;AKAP5;三叉神经核尾侧复合体

中图分类号:R741 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1022-03

Expression of AKAP5 in the Trigeminal Nucleus Caudalis after Electrical Stimulation of the Adult Rats*

JIANG Lei, YU Sheng-yuan[△], DONG Zhao, WANG Xiao-lin, LIU Jie-xiao

(Department of Neurology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of migraine by studying the gene expression of AKAP5 in animal model. **Methods:** 27 rats were randomly divided into five groups including control group (n=4), groups of electrical stimulation for 30 minutes(n=6), 60 minutes(n=6), 120 minutes(n=5) and group of morphine plus electrical stimulation for 120 minutes(n=6). Rats were rapidly decapitated, and the medulla and high-level cervical cord (to C2) were removed from the skull after electrical stimulation. AKAP5 was detected in the medulla and high-level cervical cord by western blot technique. **Results:** AKAP5 expressed in the bulb and high cervical cord. The integral optical density ratios of AKAP5 were 2.804 0.913 1.383 0.634 and 1.030 respectively. There were no significant deviation for AKAP5 expression among the five groups ($P=0.9921>0.05$). **Conclusion:** There was no significant deviation for AKAP5 expression between control and electrical stimulation groups. Morphine had no effect on AKAP5 gene expression.

Key words: Animal model; Migraine; AKAP5; Trigeminal nucleus caudalis

Chinese Library Classification: R741 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1022-03

前言

偏头痛是一种常见的原发性头痛,全球平均年平均患病率 11%,1999 年美国偏头痛研究 II 调查显示美国男性偏头痛的患病率为 6.5%,女性为 18.2%^[1]。国内最新的流行病学调查研究结果为年患病率 9.3%^[2]。按我国现有 13 亿人口计算,每年有 1.21 亿人患病。然而,其病因和发病机制尚不清楚,现有三叉神经血管反射学说、皮层扩布性抑制学说、血管源性学说等不同机制。本实验室经过多年研究、探索,在原有大鼠硬脑膜神经源性炎症模型的基础上实现了清醒状态大鼠的硬脑膜电刺激,并通过这一模型进行了多项相关研究^[3-5]。AKAP5 是一种突触后支架蛋白,在全脑中均有表达,其在谷氨酸能突触后位点含量丰富,可易化依赖 PKA 的 AMPA 和 NMDA 受体的磷酸化,可能与偏头痛的疼痛机制有关,为进一步研究偏头痛的发病机

制,我们利用电刺激大鼠的偏头痛动物模型,观察三叉神经核尾侧复合体 AKAP5 表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

实验用 SD 大鼠由解放军总医院实验动物中心提供。选取体重为 250 克左右的 SD 大鼠 27 只,随机分为 5 组:甲电刺激 30 分钟组(n=6)、乙电刺激 60 分钟组(n=6)、丙电刺激 120 分钟组(n=5)、丁吗啡干预 + 电刺激 120 分钟组(n=6)、戊对照组(n=4)。其中每组饲养于 1 个大鼠笼当中,房间温度恒定为 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照及黑夜时间各为 12 小时。

1.2 手术方法

以 10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)将实验用 SD 大鼠腹腔麻醉成功后,固定于立体定位仪上,然后用手术剪刀剪掉头正中

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30570264;30970417)

作者简介:姜磊(1976-),男,博士,主治医师,主要研究方向:头痛的基础和临床,电话:010-66876228, E-mail:nhjs76@163.com

[△] 通讯作者:于生元, E-mail: yusy1963@126.com

(收稿日期:2013-05-28 接受日期:2013-06-27)

部毛发,再以碘氟棉签消毒皮肤,然后用手术刀在头正中部由嘴侧向尾侧纵向切开皮肤 2 cm,钝性分离骨膜后彻底暴露颅骨,以颅中线冠状缝交叉点前 4 mm 为前点,交叉点后 6 mm 为后点,用台式牙科钻以中等转速钻开两个直径约 1 mm 的圆孔,两点相距 1 cm,钻孔过程中间断使用 4℃ 无菌生理盐水喷洒钻头及钻孔部位以降低钻头及孔的温度,防止灼伤硬膜。暴露上矢状窦上硬脑膜后,将与线线接口连接好的单极电极放置于钻好的圆孔中,轻柔接触硬膜;然后将整个电极以齿科粉加义齿基托树脂固定于骨面,完全干燥后缝合头皮皮肤,仅留线线接口于皮肤外;术后即刻以青霉素钠腹腔注射 (4 万 IU/100 g)预防感染,所有操作均在无菌条件下进行。

1.3 实验过程

为防止电极脱落,术后单笼饲养每只大鼠,术后三天每天均以青霉素钠腹腔注射(4 万 IU/100 g)预防感染,术后第四天将大鼠放入自主行为观察箱,将其头部皮肤外的线线接口与电刺激器线线接口相连后适应 30 分钟;甲、乙、丙组大鼠分别电刺激 30 分钟、60 分钟、120 分钟,丁组大鼠电刺激前 30 分钟给予盐酸吗啡(4 mg/kg)腹腔注射,然后电刺激 120 分钟。刺激参数为强度 2~6 mA、频率 20 Hz、脉宽 250 μ s。实验结束后将大鼠以 10 %水合氯醛腹腔注射过深麻醉后(0.8 mL/100 g)快速断头取出延髓及上颈段(至颈 2),迅速投入液氮中冷冻并储存在 -80℃ 冰箱中。

1.4 Western blot 及图象分析

冻存组织总蛋白被提取后行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,而后经转移电泳、转膜、封闭、抗体孵育及曝光等

各步骤后进行结果判定。首先将 X 光片置于读片灯,然后固定数码相机拍片,将图片拷贝入计算机后应用 Image Tool 3.0 图像分析系统对 AKAP5 蛋白和内参照蛋白(β -actin)显影条带的积分密度进行分析,计算出各样本 AKAP5 蛋白和 β -actin 的积分密度比值,从而得到 AKAP5 蛋白在各样本中的相对表达水平。Western blot 结果见图 1。

1.5 统计学处理

所有资料以 SPSS 11.0 统计软件进行分析,采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

各组中 AKAP5 蛋白均有表达,组间表达情况无显著差异 ($P=0.9921 > 0.05$)。各组 western blot 结果如图 1 所示, 各组 AKAP5 表达的积分密度比值如表 1。

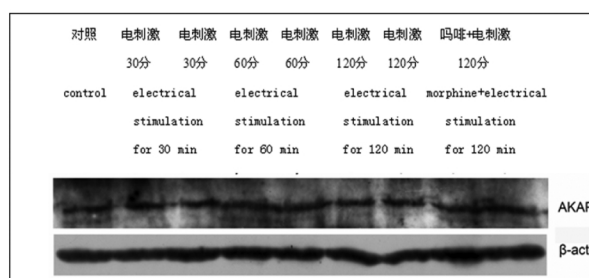


图 1 各组 AKAP5 表达情况

Fig.1 The expression of AKAP5 among groups

表 1 各组 AKAP5 表达的积分密度比值

Table 1 Integral optical density ratio of AKAP5 among groups

组别 Group	AKAP5 积分密度比值 Integral optical density ratio of AKAP5(中位数 median;四分位数 quartile)
对照组 Control	2.804(0.593, 6.228)
电刺激 30 分钟 Stimulation for 30 min	0.913(0.485, 4.922)
电刺激 60 分钟 Stimulation for 60 min	1.383(0.514, 3.961)
电刺激 120 分钟 Stimulation for 120 min	0.634(0.618, 3.624)
吗啡 + 电刺激 120 分钟 Morphine+stimulation for 120 min	1.030(0.718, 1.130)

3 讨论

AKAP5 是一种突触后支架蛋白,在全脑中均有表达,包括杏仁核、海马、纹状体,以及皮层区域如前扣带回、前额叶背外侧和眶额皮质等部位^[6],主要功能是绑定环腺苷酸依赖的蛋白激酶 A(PKA)和钙神经素。能将蛋白激酶 A 锚定在通道或受体附近,从而特定的调节这些通道或受体的磷酸化状态。其作为构成细胞内 β 肾上腺素能、多巴胺能及 5-羟色胺能信号级联系统的一部分,将 G 蛋白偶联受体与细胞内的效应分子及突触后的谷氨酸能神经递质成分相连^[7-9]。AKAP5 在谷氨酸能突触后位点含量丰富,可易化依赖 PKA 的 AMPA 和 NMDA 受体的磷酸化,从而在突触可塑性发挥作用^[10-12]。

长时程增强效应(LTP)及长时程减弱效应(LTD)组成了典型的突触可塑性。LTP 及 LTD 由钙离子经过突触后 NMDA 受体的内流介导,在 AMPA 受体功能上分别表现为持久的增强

或减弱。LTP 可活化包括 PKA 及 PKC 的激酶,促进棘突扩展、AMPA 受体磷酸化、胞吐作用及增强突触力量的侧方运动^[13]。LTD 激活包括蛋白激酶 1、2A、钙神经素在内的磷酸酶,触发棘突收缩、AMPA 受体的去磷酸化、突触内移除和细胞吞噬从而减弱突触力量。这些激酶和磷酸酶位于由支架蛋白网络组成的突触后致密物上的谷氨酸受体上^[14,15]。棘树突结构和突触后支架的改变可调节 LTP 及 LTD,因此涉及包括阿尔茨海默病、精神分裂症及自闭症等脑功能障碍^[16]。突触传递的可塑性现象不但与学习和记忆的分子机制有关,在痛觉系统也存在,而且在痛觉感受和调节中扮演重要的角色。LTP 可能是痛觉过敏和痛觉超敏现象的神经生物学基础,而 LTD 可能在机体镇痛和痛觉调控过程发挥一定作用^[17]。谷氨酸是中枢神经系统主要的神经递质。人体和动物的研究提示谷氨酸可能在偏头痛发病机制中起重要作用^[18]。

酒精刺激初级感觉神经元上的辣椒辣素受体 (TRPV1) (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) 受体, 可促进神经源性炎症反应, 包括降钙素基因相关肽 (CGRP) 介导的血管扩张。TRPV1 受体与周围感觉神经联系在一起, 其在脊髓、脑及广泛的非神经元细胞 (包括硬脑膜) 都有分布。酒精可在健康人中引起头痛, 偏头痛患者则对酒精更为敏感, 饮用红酒或啤酒可诱发头痛。最近利用豚鼠的一项研究证明 TRPV1 受体激活引起的脑膜血管扩张可能是酒精摄入诱发偏头痛发作的机制^[19]。研究证实 AKAP5 在 $91.1\% \pm 1.7\%$ TRPV1 阳性的脊髓背根神经节神经元中有共表达^[20]。AKAP5 介导 TRPV1 受体向胞膜的易位, 并可促进 TRPV1 受体的活化。AKAP5 能汇集多种酶的作用直接定位于 TRPV1 受体, 从而有效调节其磷酸化。AKAP5 将 PKA 锚定在相应位置是通过 PGE2/PKA 信号通路提高 TRPV1 受体功能所必需的^[21]。通过 PKA 和 PKC 信号通路产生的 TRPV1 受体敏化必须有 AKAP5 的参与, 类似的研究在三叉神经节细胞也经过验证。

μ 型阿片受体 MOP (μ opioid receptor) 是一种 G 蛋白偶联受体, 在培养的脊髓背根神经节细胞中, 88.4% 的神经元有 MOP 和 TRPV1 的共表达。研究吗啡作为 MOP 激动剂对 TRPV1 受体的调节作用, 发现其通过抑制环腺苷酸引起的 TRPV1 受体敏化, 从而在炎症痛病理过程中发挥镇痛作用^[22]。疼痛可引起恐惧及焦虑、抑郁, 近年来的研究发现杏仁核表达的 AKAP5 与情感处理有关。AKAP5 基因拷贝数的变化涉及精神分裂症及双向情感障碍的风险。动物研究发现依赖 AKAP5 的信号系统与恐惧记忆有关。这些均提示 AKAP5 可能与头痛有密切关系。

本研究利用电刺激模型, 对 AKAP5 在三叉神经核尾侧复合体的表达进行了研究, 发现模型组与对照组之间 AKAP5 表达无显著差异, 吗啡对 AKAP5 的表达也无显著影响, 我们根据 AKAP5 的功能预想模型组 AKAP5 表达应较对照组增加, 而吗啡会对这种增减起抑制作用, 实际结果与预想不同, 这可能与我们的样本量偏小有关。AKAP5 可能在偏头痛痛觉机制中发挥作用, 它与突触可塑性、众多离子通道等痛觉相关因素有着复杂的联系, 可能在中枢敏化方面起促进作用。AKAP5 阻滞剂 Peptide Ht 31, 可作为偏头痛的治疗药物进行研究, 其抑制头痛的机制包括: 1、抑制 NMDA 受体的激活引起的 LTP, 从而消除偏头痛中的中枢敏化; 2、抑制通过 PKA 和 PKC 信号通路产生的 TRPV1 受体敏化。今后可利用基因敲除技术对其在头痛方面进行更深入的研究, 可能开发出新型的头痛治疗药物。

参考文献 (References)

- [1] Lipton RB, Stewart WS, Diamond S, et al. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II [J]. Headache, 2001, 41(7): 646-657
- [2] Yu S, Liu R, Zhao G, et al. The prevalence and burden of primary headaches in China: a population-based door-to-door survey [J]. Headache, 2012, 52(4): 582-591
- [3] Wang X, Yu S, Dong Z, et al. The Fos expression in rat brain following electrical stimulation of dura mater surrounding the superior sagittal sinus changed with the pre-treatment of rizatriptan benzoate [J]. Brain Res, 2011, 1367: 340-346
- [4] Dong Z, Jiang L, Wang X, et al. Nociceptive behaviors were induced by electrical stimulation of the dura mater surrounding the superior sagittal sinus in conscious adult rats and reduced by morphine and rizatriptan benzoate [J]. Brain Res, 2011, 1368: 151-158
- [5] Liang J, Yu S, Dong Z, et al. The effects of OB-induced depression on nociceptive behaviors induced by electrical stimulation of the dura mater surrounding the superior sagittal sinus [J]. Brain Res, 2011, 1424: 9-19
- [6] Tunquist BJ, Hoshi N, Guire ES, et al. Loss of AKAP150 perturbs distinct neuronal processes in mice [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105: 12557-12562
- [7] Swayze RD, Lise MF, Levinson JN, et al. Modulation of dopamine mediated phosphorylation of AMPA receptors by PSD-95 and AKAP79/150 [J]. Neuropharmacology, 2004, 47: 764-778
- [8] Gardner LA, Tavalin SJ, Goehring AS, et al. AKAP79-mediated targeting of the cyclic AMP-dependent protein kinase to the beta1-adrenergic receptor promotes recycling and functional resensitization of the receptor [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 33537-33553
- [9] Sandoz G, Thummler S, Duprat F, et al. AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K (+) channels into open leak channels [J]. EMBO J, 2006, 25: 5864-5872
- [10] Gomez LL, Alam S, Smith KE, et al. Regulation of A-kinase anchoring protein 79/150-cAMP-dependent protein kinase postsynaptic targeting by NMDA receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic actin [J]. J Neurosci, 2002, 22(16): 7027-7044
- [11] Lu Y, Allen M, Halt AR, et al. Age-dependent requirement of AKAP150-anchored PKA and GluR2-lacking AMPA receptors in LTP [J]. EMBO J, 2007, 26(23): 4879-4890
- [12] Eric M. Snyder, Marcie Colledge, Robert A. Crozier, et al. Role for A Kinase-anchoring Proteins (AKAPs) in Glutamate Receptor Trafficking and Long Term Synaptic Depression [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(17): 16962-16968
- [13] Opazo P, Choquet D. A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors [J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46: 1-8
- [14] Sanderson JL, Dell'Acqua ML. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity [J]. The Neuroscientist, 2011, 17: 321-326
- [15] Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view [J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 823-847
- [16] Penzes P, Cahill ME, Jones KA, et al. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders [J]. Nat Neurosci, 2011, 14: 285-293
- [17] Ji R R, Kohno T, Moore K A, et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms [J]. Trends Neuro Sci, 2003, 26(12): 696-705
- [18] Vekelis M, Mitsikostas DD. The role of glutamate and its receptors in migraine [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007, 6(4): 251-257
- [19] Nicoletti P, Trevisani M, Manconi M, et al. Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig [J]. Cephalalgia, 2008, 28(1): 9-17

本实验我们得到如下的结论:Let-7a 在肾癌细胞株中表达显著下调,将 let-7a mimics 瞬时转染肾癌细胞株后,获得了 let-7a 的过表达。Let-7a 通过与靶癌基因 c-Myc、k-Kas 的 3'UTR 区域结合,在转录后水平调控 c-Myc、k-Kas 基因,及蛋白表达水平明显下调,进而影响肾癌细胞的增殖。Let-7a 在肾癌组织中 Let-7 表达的高低与肾癌患者预后的关系,let-7a 对肾癌的早期诊断是否有帮助?这是我们需要进一步探究的内容。所以我们认为 Let-7a 抑制肾癌细胞增殖,增进人们对肾癌发生机制的了解,并为攻克肾癌打下坚实的基础,有望成为治疗肾癌的一种新策略。

参考文献(References)

- [1] Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8): 1273-1281
- [2] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466 (7308): 835-840
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233
- [4] Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, et al. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(14): 3112-3127
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [6] Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(6): 1378-1386
- [7] Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer[J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9(76): 1471-1476
- [8] Wang M, Hu Y, Amatangelo MD, et al. Role of ribosomal protein RPS2 in controlling let-7a expression in human prostate cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(1): 36-50
- [9] Voortman J, Goto A, Mendiboure J, et al. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8288-8298
- [10] He Xiao-yan, Chen Jun-xia, Zhang Zheng, et al. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(7): 1023-1028
- [11] DONG Qing-chuan, WANG Tao, QIN Wei-wei, et al. MicroRNA Let-7a Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Targeting E2F2 and CCND2 [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (4): 1371-1378
- [12] Cai K, Wan Y, Sun G, et al. Let-7a inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting EZH2 in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 2101-2106
- [13] Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach [J]. *Genes Dev*, 2008, 22 (20): 2755-2766
- [14] Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(4): 318-330
- [15] Tang SW, Chang WH, Su YC, et al. MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 273(1): 35-43
- [16] Yamada Y, Hidaka H, Seki N, et al. Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(3): 304-312
- [17] Yamamura S, Saini S, Majid S, et al. MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (2): 294-300
- [18] Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(5): 862-867
- [19] Miller KA, Yeager N, Baker K, et al. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3689-3694
- [20] Kamai T, Arai K, Koga F, et al. Higher expression of K-ras is associated with parathyroid hormone-related protein-induced hypercalcaemia in renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*, 2001, 88(9): 960-966
- [20] Zhang XM, Li L, McNaughton PA. Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150[J]. *Neuron*, 2008, 59(3): 450-461
- [21] Schnizler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, et al. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(19): 4904-4917
- [22] Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, et al. The μ opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway [J]. *Molecular Pain*, 2006, 2: 22

(上接第 1024 页)