

·基础研究·

大鼠背根神经节持续受压后差异蛋白质表达分析*

张 杨¹ 张 燕² 王永慧¹ 张旭华³ 邵建敏⁴ 岳寿伟^{1,5}

摘要

目的:使用蛋白质组学方法筛查大鼠背根神经节(DRG)持续受压(CCD)后差异表达的蛋白质,特别是筛查与疼痛和组织损伤相关的蛋白。

方法:78只Wister大鼠随机分为正常组和CCD组,建立CCD模型后,测量行为学指标。28d后处死大鼠,从DRGs中提取蛋白,进行双向电泳分离蛋白,找出差异表达蛋白,使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析得到其肽指纹图谱(PMF),进行鉴定。使用Western blotting和实时RT-PCR验证部分差异蛋白。

结果:CCD明显降低机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期。正常组和CCD组98个蛋白点的表达存在明显差异,成功鉴定出15种蛋白,其中8种蛋白的表达在CCD组下调,7种蛋白表达上调(其中1种蛋白只存在于CCD组)。验证显示与质谱分析的结果相符。

结论:以差异蛋白质组学的方法分析CCD对DRG蛋白质表达的影响,鉴定出15种差异表达的蛋白。其中膜联蛋白A2、p11和蛋白激酶C ϵ (PKC ϵ)蛋白表达的上调,可能参与了神经性疼痛的发生过程。三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的上调或许参与神经元凋亡,热休克蛋白70(HSP70)的表达上调或许与神经保护有关。

关键词 蛋白质组学;神经病理性疼痛;持续压迫背根神经节;生物质谱

中图分类号:R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-10-0928-09

Proteomic analysis of differential proteins in dorsal root ganglion after chronic compression in rats/ZHANG Yang, ZHANG Yan, WANG Yonghui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25 (10): 928—936

Abstract

Objective:To identify the differential protein expressions related to neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion (DRG) after chronic compression of DRG (CCD) in rats.

Method: Seventy-eight Wister rats were randomly divided into normal group and CCD group. After CCD model was established, behavior measurements were administered in rats. Proteins and peptides were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2DE). The differentially expressed proteins were found, and the peptide mass fingerprint (PMF) of protein spots were identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to study differential proteomic expressions in the L4 and L5 DRGs. Western blotting and real time RT-PCR were used to verify a part of differential proteins.

Result: Mechanical withdrawal threshold and thermal drawal latency reduced significantly in CCD rats. Over 400 protein spots were visualized in normal group and CCD group respectively. A total of 98 spots were differentially expressed in these two groups and 15 spots were identified by MS analysis, of which, 8 down-regulated in CCD group and 7 up-regulated (only 1 detected in CCD group). The results of Western blotting and real-time quantitative RT-PCR experiments showed consistent with the data of proteomic analysis.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.10.003

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30872732,81071597);山东省自然科学基金资助课题(Z2007C04)

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南,250012; 2 章丘市中医医院疼痛科; 3 山东大学第二附属医院检验科; 4 中国科学院蛋白质组学研究中心; 5 通讯作者

作者简介:张杨,女,博士,主治医师; 收稿日期:2010-08-01



Conclusion: With proteomic analysis of differential proteins, the influence of CCD on the proteins expressions in DRG and the molecular process in DRG underlying neuropathic pain were determined. CCD was associated with the up-regulation of annexin A2 and protein kinase C ϵ (PKC ϵ) and their related genes. The up-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase(GAPDH) and heat shock protein 70(HSP70) suggested that concurrent processes of nervous injury and neuroprotection in the course of neuropathic pain were existed.

Author's address Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Qilu Hospital, Medical school of Shandong University, Jinan, 250012

Key words proteomics; neuropathic pain; chronic compression of dorsal root ganglion; mass spectrometry

背根神经节在腰腿痛的发病过程中有重要作用,各种损伤因素导致背根神经节持续受压(chronic compression of dorsal root ganglion, CCD)可产生根性神经痛,通常会伴发神经元的兴奋性升高,表现为异位放电,阈值下降等^[1-2],但其机制目前并不清楚。

有研究者使用基因组学和蛋白质组学,对病理性神经痛模型的 DRG 进行研究,如坐骨神经压迫或切断模型^[3-4],脊神经结扎模型^[5-6]等,筛选出多种与神经元死亡和再生有关的基因和蛋白,包括细胞骨架蛋白,神经递质代谢酶,炎性因子,合成/成熟相关蛋白和髓鞘形成相关蛋白等。这些研究使我们对外周神经损伤后神经退化和微环境改变的机制有了较深入的了解。由于不同病理模型的行为学和病理变化不同,其基因和蛋白质的变化也不同。所以研究不同病理状态下的蛋白质的变化,可以帮助我们了解神经病理状态的分子生物学机制^[9]。

CCD 模型中,插入钢棒不仅导致机械压迫、DRG 缺血、组织水肿^[7-8],而且伴发多种炎性因子的释放,如神经营养因子、细胞因子、质子、自由基、组织胺、缓激肽、5-羟色胺和类前列腺素等^[9],因此 DRG 神经元的高兴奋性和异常疼痛是由直接、持续性压迫和继发性炎症反应所共同导致的,是模拟椎间盘突出压迫神经节导致放射性疼痛病理状态的良好模型。

本文采用蛋白质组学的方法,分析了 CCD 和正常大鼠的差异蛋白的表达,使用 Western blotting 进行了验证,并使用实时定量 PCR 方法观察了相应基因的变化,从而探讨神经损伤和保护的分子机制,特别是放射性痛的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与主要仪器

健康雄性 Wistar 大鼠由山东大学实验动物中心提供。

蔗糖和硫脲购自美国 Sigma 公司;尿素,Tris 碱,3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio] -1 -Propanesulfonate, CHAPS),二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT),溴酚蓝,十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),玻璃板硅烷化剂,过硫酸铵(ammonium persulfate, APS),碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAA),丙烯酰胺(acrylamide),N,N'-E 甲基丙烯酰胺(N,N'-methylene-bisacrylamide),四甲基乙二胺(TEMED),三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA), α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA),甘氨酸(glycine),低熔点琼脂糖(low melting agarose)均购自德国 Merck 公司。试剂固相 pH 梯度干胶条(immobilized pH gradient strip, pH 3-10)和缓冲液(IPG buffer, pH3-10 NL)购自英国 Amersham 公司。annexin A2 抗体、p11 抗体、HSP70 抗体、PKC ϵ 抗体和 β -actin 抗体购自英国 Abcam 公司, GAPDH 抗体购自美国 Sigma 公司。辣根酶标记二抗购自北京中杉。RNA 逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品。增强发光试剂盒购自英国 Amersham 公司。SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒购自 Takara 大连宝生物工程有限公司。

BME-403 型 von Frey 机械痛刺激仪和 BME-410A 型热痛刺激仪,均为中国医学科学院生物医学工程研究所生产。IPGphor 等电聚焦仪, Ettan DALT six 大型垂直电泳系统, Typhoon9400 型多功能激光扫描仪及软件, LabScan 软件和 ImageMaster V5.0 软件购自瑞典 Amersham Biosciences 公司。基质辅助激光解吸/离子化-飞行时间质谱仪(MALDI-TOP-MS)为德国 Bremen 公司生产。数字凝胶成像系

统为美国 Alpha Innotech 公司 Flurochem 9900-50 型。实时定量 PCR 仪为瑞士 Roche 公司 lightcycler 2.0 型。

1.2 CCD 模型的建立与行为学测量

1.2.1 分组: 健康雄性 Wistar 大鼠 78 只 (体重 150—180g), 由山东大学实验动物中心提供。随机分成正常组和 CCD 组, 每组均为 39 只。由于我们的预试验显示假手术组大鼠的行为学指标未发生变化, Zhang 等^[10]的试验也显示假手术组大鼠神经元的电生理性质也未发生变化, 所以就没有设置假手术组, 而用正常组作为对照。

1.2.2 CCD 模型的建立: 手术组大鼠用戊巴比妥钠 (50mg/kg) 行腹腔注射麻醉, 腰骶部剃毛, 常规消毒, 铺无菌巾。沿 L4-S1 棘突作后正中偏右切口, 钝性分离至横突, 暴露右侧 L4 及 L5 椎间外孔后, 将“L”形棒 (直径 0.63mm, 每侧长度 4mm) 的一端沿 L4 及 L5 椎间外孔的前壁上方水平插入椎管内, 另一端位于椎管壁外, 使之挤压 L4、L5 DRG^[7]。术后依次缝合各层结构, 腹腔注射青霉素 40 万单位预防感染。术后一周拆线, 于术后 28d 处死动物。

1.2.3 机械痛阈和热痛阈的测量: ①运动功能 (motor function): 观察动物自然状态下随意行走的步态, 采用记分制: 1 分=正常步态、足无畸形; 2 分=正常步态伴明显足畸形; 3 分=轻度步态障碍伴足下垂; 4 分=严重步态障碍伴肌无力。②机械痛阈值 (mechanical withdrawal threshold) 测量: 每次测定前先让动物安静 15—20min, 选择刺激强度为 0.09g、1.19g、3.80g、5.80g、7.60g、10.12g、17.30g 的 Von Frey 针丝, 依次刺激动物手术侧足底 3、4 趾间皮肤, 如大鼠产生明显的缩爪或舔足, 即为阳性反应。每只大鼠均从小剂量的针丝开始刺激, 上限为 17.30g, 每根针丝测量 5 次, 至少能够引发 3 次缩爪反应的针丝强度即为机械痛阈值。每次测量时使尼龙丝弯曲到相同的弧度, 以确保每次施加的刺激相同。③热辐射刺激缩爪反应潜伏期 (thermal withdrawal latency): 将动物放在 6mm 厚有机玻璃板上, 当大鼠损伤侧后爪接触玻璃板时, 将热痛刺激仪放在有机玻璃板下方, 使光源焦距照射动物后肢足底掌心, 电子秒表记录从照射开始到引起后肢回缩反应时的潜伏期作为热痛觉观测指标^[11]。读数精确到 0.01s。取每只大鼠 5

次测量结果的均值为统计数据, 测量间隔时间为 5min。事先调节光照强度, 使平均潜伏期约 10s。上限为 20s, 以免造成组织损伤。

1.3 双向电泳和图像分析

从正常组和 CCD 组各 20 只大鼠的 L4 和 L5 DRGs 中提取蛋白, Bradford 法定量。取蛋白质 200μg, 再加入适量再水化液, 使总体积达 340μl, 加至 18cm 胶条槽。将胶条槽放到 IPGphor 等电聚焦仪器操作平台上, 行等电聚焦。IEF 后的胶条取出后, 分别在平衡液中进行 2 步平衡, 各 15min。将胶条移至 12.5% 凝胶顶端, 0.5% 琼脂糖封闭液包埋, 进行第二相电泳, 冲洗固定后, 进行硝酸银染色。凝胶通过扫描仪及 Labscan 扫描软件进行扫描获取图像, 利用 Image Master 2D platinum 5.0 对图像进行蛋白质点的检定、定量、匹配, 找出差异表达蛋白。同一标本重复电泳 3 次。正常组和 CCD 组之间, 斑点体积变化超过 3 倍的蛋白, 为差异表达蛋白。

1.4 质谱样品制备及质谱分析

将差异显著的蛋白质点从凝胶上切取、冲洗、使用胰酶消化。使用 MALDI-TOF-MS 鉴定蛋白质斑点的肽指纹图谱 (peptide mass fingerprint, PMF), 在互联网上使用 Mascot 检索软件验证质谱本地检索的蛋白质信息 (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)。比较本地和在线检索数据的一致性, 对两种软件检索数据一致的认为是成功鉴定出的蛋白质。

1.5 Western blotting

三只大鼠的 6 个 DRG 作为一个样本提取蛋白, Bradford 法定量后, 每个样本取蛋白质 30μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜后, 牛奶封闭。然后分别加入一抗 (annexin A2、p11、HSP70、GAPDH、PKCε 和 β-actin), 4℃过夜, 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 2h。按照发光试剂盒的说明进行放射自显影, 使用凝胶图像处理系统分析条带光密度, 目的条带与内参 β-actin 强度的比值作为结果, 每组均 3 个样本, 每个样本重复 3 次。

1.6 实时定量 PCR

一只大鼠的 2 个 DRG (L4 和 L5) 作为一个样本, 使用 Trizol 提取细胞总 mRNA, 逆转录成 cDNA, 以



反转录后的 cDNA 为模板分别加入引物和 SYBR PCR buffer 等进行 PCR 反应。膜联蛋白 A2 (Annexin A2) 引物序列为:Forward:5'-CTGGAGAC-CGTGATGTTAG-3';Reverse: 5'-ATCCTCTGCC-CGTTTACC-3'。蛋白激酶 C epsilon (protein kinase C epsilon, PKC ϵ)引物序列为:Forward: 5'-GCCAC-CAAGCAGAAGACC-3';Reverse: 5'-GAAGTGACG-GCTCCCATT-3'。 β -actin 引物序列为:Forward: 5'-AGACCTTCAACACCCAG-3'; Reverse: 5'-CAC-GATTTCCCTCTCAGC-3'。为确保扩增片断为目的基因,扩增产物均进行凝胶电泳。结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,目的基因与 β -actin 的相对比值作为结果。每组均 10 个样本,每个样本重复 3 次。

1.7 统计学分析

使用 2-way (time $\times$ group) repeated measures ANOVA 分析对照组和 CCD 组间机械痛阈、热辐射刺激缩爪反应潜伏期的差别, t 检验分析各组间蛋白表达的差别,Mann-Whitney Rank Sum Test 分析各组间基因表达的差别。Student-Newman-Keuls test 作为 post-hoc 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 CCD 明显降低机械痛阈和热辐射刺激缩爪反

应潜伏期

所有大鼠的运动功能均正常。CCD 明显降低机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期(图 1, $P < 0.05$)。从第 2 天开始,机械痛阈下降,到第 4 天达到最低值,然后逐渐恢复,但直到术后 28d,CCD 组大鼠的机械痛阈仍明显低于正常对照大鼠 ($P < 0.05$, SNK)。热辐射刺激缩爪反应潜伏期的变化趋势与机械痛阈相似,CCD 明显降低热辐射刺激缩爪反应潜伏期($P < 0.05$, SNK)。

2.2 差异蛋白分析和鉴定

双向电泳图谱见图 2,对照组和 CCD 组分别得到 454 ± 4 ($n=3$)和 423 ± 4 ($n=3$)个蛋白点。98 个蛋白点的表达存在明显差异。质谱分析成功鉴定出 15 种蛋白,其中 8 种蛋白的表达在 CCD 组下调,7 种蛋白表达上调,其中 1 种蛋白只存在于 CCD 组。鉴定出的蛋白质的信息见表 1—2,这些蛋白主要包括:①信号相关蛋白:膜联蛋白 A2 和蛋白激酶 C ϵ (PKC ϵ);②细胞代谢相关蛋白:三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),磷酸葡萄糖异构酶和 ATP 合酶 α 亚单位前体(EC 3.6.1.3);③细胞骨架蛋白:微管蛋白 $\beta 5$,肌动蛋白 γ 和肌球蛋白轻链 6;④抗氧化剂/陪伴蛋白/热休克蛋白 (HSP):HSP 70kD 类似蛋白和泛素 C-末端水解酶同工酶 L1(UCH-L1);⑤转录和

表 1 表达量下调的蛋白

No ^①	NCBI-Gi	Protein identified	Score ^②	Mass ^③ (Da)	pI ^③	Seq.Cover (%)	Peptides matched
5	gil203055	ATP synthase alpha subunit precursor (EC 3.6.1.3)	305	58904	9.22	59	26
6	gil56754676	Tubulin beta-5 chain	74	50095	4.78	39	12
7	gil86129584	Hypothetical protein LOC497978	82	47394	8.91	22	8
8	gil62645364	Similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	124	42108	5.31	47	15
12	gil62664759	Predicted:prohibitin	123	27757	5.44	38	11
13	gil68844977	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCH-L1) (Ubiquitin thiolesterase L1)	120	25165	5.14	39	9
14	gil62663617	Glutathione peroxidase 5	70	21473	9.64	52	8
15	gil2842665	Myosin light polypeptide 6	62	17135	4.46	33	5

①在双向电泳胶图上的编号;②score>60 认为是可信结果;③为基于 Ex-PASy 查询结果的理论分子量和等电点

表 2 表达量上调的蛋白

No ^①	NCBI-Gi	Protein identified	Score ^②	Mass ^③ (Da)	pI ^③	Seq.Cover (%)	Peptides matched
1	gil49359177	Protein kinase C epsilon	62	84891	6.62	20	12
2	gil204667	70 kDa heat-shock-like protein	62	71055	5.37	38	9
3	gil22761814	Centrosomal protein CG-NAP	66	52202	5.03	25	12
4	gil62659539	Similar to 40S ribosomal protein S17	63	50487	6.32	23	9
9	gil584760	Annexin A2	138	38939	7.55	32	14
10	gil21322619	Elongation factor 2	72	34313	6.04	23	5
11	gil8393418	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases	99	36090	8.14	40	10

①在双向电泳胶图上的编号;②score>60 认为是可信结果;③为基于 Ex-PASy 查询结果的理论分子量和等电点

翻译相关蛋白:40S 核糖体蛋白 S17 类似物和中心小体蛋白(CG-NAP)。

2.3 Western blotting 分析蛋白质表达变化

为了验证双向电泳和质谱分析的结果,我们使用 Western blotting 分析了 annexin A2、PKC ϵ 和 GAPDH 的表达的变化。而且由于 p11 是 annexin II heterotetramer 重要的组成部分,所以也做了检测。由于没有针对 70 kDa HSP 类似蛋白合适的抗体,所以我们检测了 HSP70。结果如图 3 所示,这五种蛋白

在 CCD 组均升高,与质谱分析的结果相符。

对照组和 CCD 组 β -actin 的表达量无明显变化(图 3F, $t=-0.139$, $P=0.896$),因此适合作为内参。

2.4 Real-time PCR 测量疼痛相关蛋白的基因转录的变化

与对照组相比,持续压迫可以明显增加 annexin A2 和 PKC ϵ 的基因表达,分别为对照组的 4.55 和 3.65 倍(图 4, $P<0.05$)。

图 1 机械痛阈(A)和热辐射刺激缩爪反应潜伏期(B)的时间变化曲线

* 与对照组大鼠相比 $P<0.05$ 。BL:baseline

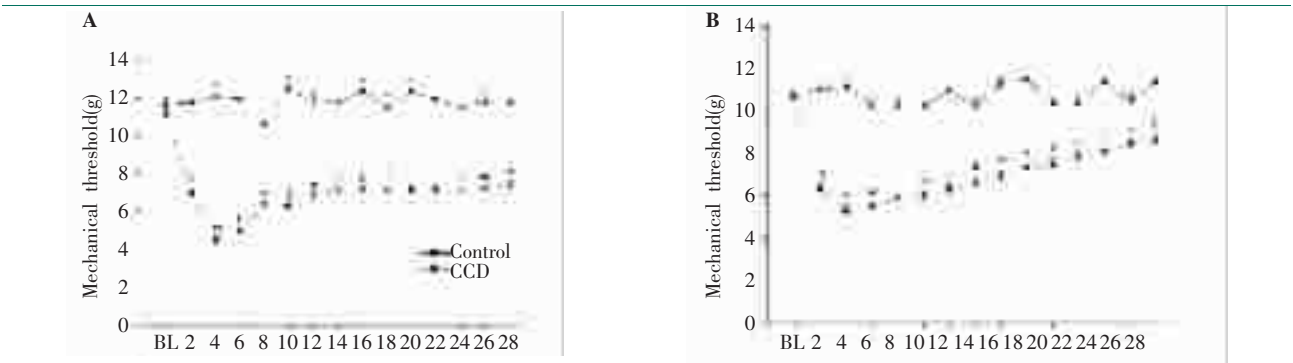
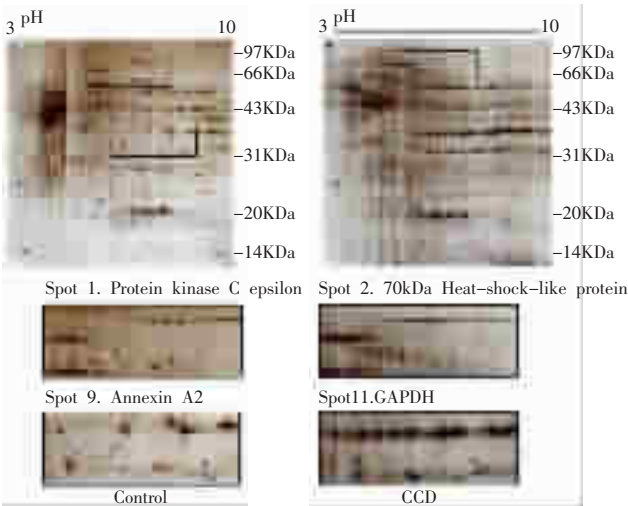


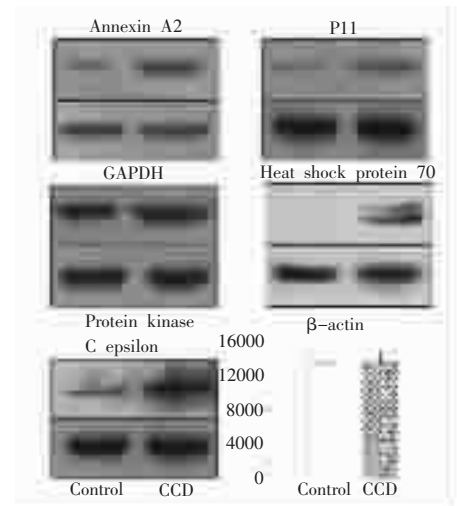
图 2 大鼠背根神经节双向凝胶电泳图谱 (A)对照组, (B)CCD 组, (C)部分差异表达蛋白质点的局部放大



3 讨论

使用蛋白质组学的方法,我们观察了 CCD 对 DRG 蛋白质表达的影响。对照组和 CCD 组分别得到 454 ± 4 ($n=3$) 和 423 ± 4 ($n=3$) 个蛋白质点。98 个蛋白点的表达存在明显差异,质谱成功鉴定出 15 种蛋白,其中 8 种蛋白的表达在 CCD 组下调,7 种蛋白

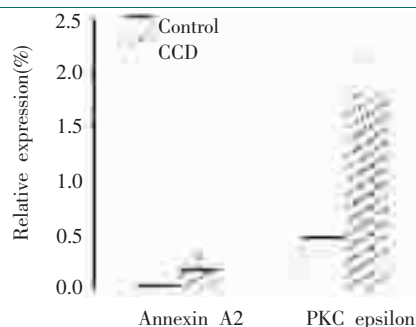
图 3 蛋白表达的变化



表达上调(其中 1 种蛋白只存在于 CCD 组)。这些蛋白参与了多种细胞活动,其中膜联蛋白 A2 和 PKC ϵ 与神经性疼痛有关,GAPDH 蛋白与神经元损伤有关,热休克蛋白 70 与神经元保护有关。Western blotting 的结果与质谱分析的结果相一致。Real-time PCR 分析显示,CCD 也可增加膜联蛋白 A2 和

图4 持续压迫 28d 后,受损背根神经节中 annexin A2 和 PKC ϵ 基因表达的变化

每组 n=10。* 与对照组相比 $P<0.05$



PKC ϵ 基因的表达。

3.1 膜联蛋白 A2 和 PKC ϵ 蛋白表达量的增加

由于 DRG 持续受压后,周围微环境也发生变化,所以神经性疼痛的机制仍未明确。通常认为,损伤位置及相应神经元细胞膜上离子通道的聚集导致了损伤后兴奋性异常高^[12]。我们的结果发现,膜联蛋白 A2、p11 和 PKC ϵ 的表达在 CCD 后明显升高。膜联蛋白 A2 和 p11 参与多种离子通道和受体的转运,PKC ϵ 是一种重要的第二信使,参与多种痛觉的传导过程,这两种蛋白表达的增加,或许与神经性疼痛有关。

膜联蛋白 A2 是由 2 个 annexin II 和 p11 (S100A10)二聚体组成的四聚体,以钙依赖性方式与酸性磷脂、肝磷脂和 F-actin 相连。膜联蛋白 A2 与物质的膜转运有关,如胞吐作用和胞吞作用。p11 与多种离子通道和受体的转运有关,如电压依赖性 Nav1.8, TWIK-related acid-sensitive K^+ channel (TASK-1), 配体门控性酸敏感性离子通道 1a (ligand-gated ion channels acid-sensing ion channel 1a, ASIC1a), 瞬时感受器电位香草素受体 5/6 (transient receptor potential vanilloid 5/6, TRPV5/V6), 5-羟色胺受体 1B (5-hydroxytryptamine receptor 1B, 5-HT1B) 和 G 蛋白偶联受体^[13]。Foulkes^[13]等发现删除小鼠伤害性感受器神经元的 p11 会抑制 Nav1.8 的表达。Nav1.8 离子通道是介导 C-纤维 DRG TTX-R 电流的主要通道,与神经性疼痛直接相关^[14]。虽然在不同的病理模型 Nav1.8 表达量的变化趋势不完全相同,但多数研究者都认为 Nav1.8 的重新分布与神经性疼痛的发生密切相关^[15-16]。p11 与 ASIC1a 的

表达也有关^[17]。ASIC1a 主要表达于小直径伤害性感受器神经元,可以感受各种病理生理和疼痛状态下神经外部环境的酸化,如炎症、血肿、水肿、骨折、水疱、感染、局部缺血和肿瘤^[18]。p11 在炎症状态下存在双重作用,一方面,通过增加伤害有关的离子通道,增加损伤区域的痛觉感受;另一方面,通过抑制磷脂酶 A2,反馈性抑制类花生酸的生成,从而降低痛觉^[19]。De Leon 等^[20]发现坐骨神经损伤后, p11 的表达上调,与我们的结果相一致。因此,CCD 后膜联蛋白 A2 和 p11 表达的上调提示其可能通过参与与痛觉有关的离子通道的转运,从而参与神经病理性疼痛过程。

另一种在 CCD 后表达上调的蛋白为 PKC ϵ 。PKC ϵ 表达于大多数小直径和部分中等直径 DRG 神经元^[21],是一种重要的第二信使,参与炎症^[22-23],外周神经痛(如糖尿病性神经痛)^[24],慢性酒精中毒^[25]和肿瘤化疗^[26]引起的痛觉敏化,也参与了从急性疼痛到慢性疼痛状态的转变过程^[27-28]。Zhou 等^[29]报道角叉菜胶和完全福氏佐剂性炎症模型中,DRG 中 PKC ϵ 磷酸化明显升高,而坐骨神经缩窄性损伤后,PKC ϵ 磷酸化明显降低。PKC ϵ 可以通过多种途径参与痛觉的传导。一种途径是 PKC ϵ 通过激活初级感觉神经元蛋白酶激活受体 2 (protease-activated receptor 2, PAR2),敏化 TRPV1 通道功能,从而介导神经源性炎症和痛敏。另一种途径是 PKC ϵ 通过敏化 TTX-R 钠通道的活性,介导机械痛敏^[30]。我们的质谱分析结果显示 CCD 28d 后,PKC ϵ 的表达明显升高,PCR 显示其基因表达也升高。这提示 PKC ϵ 或许参与了 CCD 导致的机械和温度痛敏。

除了传导痛觉,PKC ϵ 的调节区还能够促进轴突的生长^[31-32],这种作用不依赖于其催化活性^[33-34]。因此,PKC ϵ 或许参与了持续受压后 DRG 内多种病理过程的发生。

3.2 GAPDH 和 HSP70 蛋白表达的增加

神经系统内,损伤和应激状态下细胞因子和炎症因子的释放,能够对神经元造成损伤^[35]。GAPDH 是糖酵解过程中的一个关键酶,在各种生理和病理状态下,GAPDH 的表达通常都很稳定,它常常作为分析其他蛋白质结构和功能的内参照^[36-37]。越来越多的研究发现,GAPDH 有与糖酵解功能无关的若干

不同的活性,包括膜融合、微管成束、磷酸转移酶活性、核 RNA 运输、DNA 复制和 DNA 修复,参与细胞凋亡以及年龄相关性神经性疾病和病毒性疾病,同时 GAPDH 也是一个 NO 的独特修饰目标^[38]。现已有多种证据提示 GAPDH 在多种神经退行性疾病参与了细胞凋亡过程^[39]。Kim 等在 100mmHg 压力下培养 RGC-5 视神经节细胞,发现 GAPDH 的表达增高,并向核内转移,该变化有时间依赖性,并与神经元凋亡发生的时程相一致^[40]。同时,我们研究组前期的试验发现,持续受压后 DRG 神经元的凋亡数量增加^[41]。三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的表达增高和神经元的凋亡增加在时间上的一致性,提示 GAPDH 可能参与了 CCD 后神经元的凋亡过程。

损伤后,机体启动细胞自我保护,多种与抗氧化和保持神经元结构完整功能相关蛋白表达上调。热休克蛋白 70 (HSP70) 是应激反应过程中的重要产物,热、氧化应激、创伤和感染等多种伤害性刺激均可导致 HSP70 的产生。给予离体的动物心脏热或局部缺血刺激,心肌内开始表达 HSP70^[42]。HSP70 能够保持细胞内蛋白的完整和抑制神经元变性,从而起神经保护作用。Cizkova^[43]等的研究发现,马尾牵缩导致的下腰部和骶神经根的受压,可导致脊髓和相应节段的 DRG 的 HSP70 的免疫反应性升高,而正常组和假手术组 DRG 神经元不表达 HSP70^[44]。其他的研究小组在不同的外周神经损伤模型上也发现了同样的结果^[6,45]。与以上所述结果类似,我们在对照组未发现 HSP70 的表达,而 CCD28d 后,HSP70 的表达明显升高,提示 HSP70 的表达是机体启动细胞自我保护的表现。

3.3 内参的选择

为了去除上样量对测量结果的影响,多数分子生物学试验需要使用内参来减少系统误差。目前被广泛使用的内参包括肌动蛋白(Actin)(特别是 β -actin),GAPDH,微管蛋白,亲环蛋白(cyclophilin),延长因子 1 α (elongation factor 1- α , e1 α),泛素,18sRNA 等^[46]。这些成分的表达通常很稳定,但是某些药物和病理条件也会改变它们的表达。我们的结果显示,CCD 没有影响 β -actin 的表达,而 GAPDH 的表达升高了。与我们的试验结果相符,其他研究者也曾在脊神经结扎模型,CCD 模型,神经根结扎模型等

病理模型中使用 β -actin 作为内参,其表达量与假手术组无明显差别。所以研究者普遍认可使用 β -actin 作为内参不会引起系统误差^[47-48]。因此,本试验中 β -actin 适合作为内参。

在本试验中,我们选用了单克隆 β -actin 抗体(ab6276, Abcam),其蛋白质结构是特异针对 β -actin (synthetic peptide: DDDIAALVIDNGSGL)。实时定量 PCR 试验部分,引物也是特异针对 β -actin (Seq No. 455-708)的。所以不会与 γ -actin 相混淆。质谱分析结果显示 γ -actin 的表达有变化,可能是 γ -actin 的修饰所导致。

在我们所鉴定出的蛋白中,部分蛋白已被证明在其他外周神经损伤模型中表达量也发生了变化,如 GAPDH^[4],HSP70^[6,49],PKC ϵ ^[29],膜联蛋白 A2,ATP 合成酶 α 亚单位前体和微管蛋白 β ^[49]。部分蛋白是从未报道过的,如 40S 核糖体蛋白 S17 和中心小体蛋白(CG-NAP)。这些蛋白在外周神经损伤过程中起的作用需要进一步研究。本试验结果与先前报道的外周性神经损伤模型质谱分析结果的比较见表 3。不同病理模型表现出不同的蛋白调控方式,也证明了不同类型的损伤引起机体不同的适应性改变。

4 结论

我们使用差异蛋白质组学的方法,分析了 CCD 对 DRG 蛋白质表达的影响,鉴定出 15 种差异表达的蛋白。其中膜联蛋白 A2、p11 和 PKC ϵ 蛋白表达的上调,可能参与了神经性疼痛的发生过程。GAPDH 的上调或许参与神经元凋亡,HSP70 的表达上调或许和神经保护有关。

参考文献

- [1] Ma C, Greenquist KW, Lamotte RH. Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurophysiol, 2006, 95(4):2098—2107.
- [2] Tan ZY, Donnelly DF, LaMotte RH. Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in cutaneous afferent neurons [J]. J Neurophysiol, 2006, 95(2):1115—1123.
- [3] Costigan M, Befort K, Karchewski L, et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury[J]. BMC Neurosci, 2002, 3:16.
- [4] Jimenez CR, Stam FJ, Li KW, et al. Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration[J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(2):120—132.
- [5] Wang H, Sun H, Della Penna K, et al. Chronic neuropathic



表 3 与其他外周神经损伤模型蛋白质组学结果比较

研究	动物模型	组织	双向电泳分离出 蛋白质数目	差异蛋白质 数目	主要结果
Jimenez,et al ^[4]	压迫坐骨神经	压迫处远端坐骨神经组织	1500	121	GAPDH (↓) Alpha-crystallin B (↓) Heat shock protein 27(↓) Cathepsin B (↑) Apolipoprotein D (↑) Annexin V (↓)
Komori,et al ^[6]	L5 神经根结扎	损伤同侧和对侧 L4、L5 DRG	1300	67	Heat shock 70-kDa protein 2 (↑) Heat shock protein 27(↑) Actin β or γ (↑) Annexin A1 and A3(↑) UDP glucose dehydrogenase (↑) Phosphoglycerate kinase 1 (↑) ATP synthase β-subunit (↓)
Kang,et al ^[49]	脊髓损伤	受损的脊髓组织	947	68	H1-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14)alpha chain precursor (↑) Voltage dependent anion channel 1(↑) Annexin A2 and 5 (↑) Tubulin beta chain 15(↑) Heat shock 70 kDa protein 1, 4, and 5(↑) Heat shock 27 kDa protein 1(↓) Proteasome subunit (↑) Antioxidant protein 2;acidic calciumindependentphospholipaseA2 (↑)
Lee,et al ^[50]	L5-L6 神经根结扎	受损的脊髓组织	1750	5	L-lactatedehydrogenase (↑) Guanine nucleotidebindingprotein Go (↑) Creatine kinase B (↓)
Zhang,et al	慢性压迫背根神经节	损伤侧 L4、L5 DRG	>400	15	Protein kinase C epsilon (↑) 70 kDa heat-shock-like protein (↑) Annexin A2 (↑) GAPDH (↑) ATP synthase alpha subunit precursor (↓) Tubulin beta-5 chain (↓)

pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases [J]. Neuroscience,2002,114(3):529—546.

- [6] Komori N, Takemori N, Kim HK, et al. Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury [J]. Physiol Genomics, 2007, 29(2):215—230.
- [7] Song XJ, Hu SJ, Greenquist KW, et al. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after chronic compression of dorsal root ganglia [J]. J Neurophysiol, 1999, 82(6):3347—3358.
- [8] Igarashi T, Yabuki S, Kikuchi S, et al. Effect of acute nerve root compression on endoneurial fluid pressure and blood flow in rat dorsal root ganglia [J]. J Orthop Res, 2005, 23(2):420—424.
- [9] Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain[J]. Curr Biol, 2006, 16(16):1591—1605.
- [10] Zhang JM, Song XJ, LaMotte RH. Enhanced excitability of

sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. J Neurophysiol, 1999, 82(6):3359—3366.

- [11] Villetti G, Bergamaschi M, Bassani F, et al. Antinociceptive activity of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide hydrochloride (CHF3381) in experimental models of inflammatory and neuropathic pain [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(2):804—814.
- [12] Devor M, Seltzer Z. Cellular and molecular mechanisms of ectopic hyperexcitability [M]. Beijing: Science, 2001, 1492—1520.
- [13] Foulkes T, Nassar MA, Lane T, et al. Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior[J]. J Neurosci, 2006, 26(41):10499—10507.
- [14] Lai J, Gold MS, Kim CS, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8[J]. Pain, 2002, 95(1—2):143—152.
- [15] Decosterd I, Ji RR, Abdi S, et al. The pattern of expression

- of the voltage-gated sodium channels Na (v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models[J]. *Pain*, 2002, 96(3):269—277.
- [16] Gold MS, Weinreich D, Kim CS, et al. Redistribution of Na (V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1):158—166.
- [17] Donier E, Rugiero F, Okuse K, et al. Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(46):38666—38672.
- [18] Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004, 3(1): 71—79.
- [19] Wu T, Angus CW, Yao XL, et al. P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(27):17145—17153.
- [20] De Leon M, Van Eldik LJ, Shooter EM. Differential regulation of S100 beta and mRNAs coding for S100-like proteins (42A and 42C) during development and after lesion of rat sciatic nerve[J]. *J Neurosci Res*, 1991, 29(2):155—162.
- [21] Khasar SG, Lin YH, Martin A, et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice[J]. *Neuron*, 1999, 24(1):253—260.
- [22] Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, et al. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(16):13375—13378.
- [23] Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, et al. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309(2): 616—625.
- [24] Joseph EK, Levine JD. Sexual dimorphism in the contribution of protein kinase C isoforms to nociception in the streptozotocin diabetic rat[J]. *Neuroscience* 2003, 120(4):907—913.
- [25] Dina OA, Barletta J, Chen X, et al. Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22):8614—8619.
- [26] Joseph EK, Levine JD. Sexual dimorphism for protein kinase c epsilon signaling in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy [J]. *Neuroscience*, 2003, 119(3): 831—838.
- [27] Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(12):4680—4685.
- [28] Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, et al. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat[J]. *Neuroscience*, 2003, 120(1):219—226.
- [29] Zhou Y, Li GD, Zhao ZQ. State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(3):571—580.
- [30] Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice[J]. *J Physiol*, 2006, 575(Pt 2):555—571.
- [31] Hundle B, McMahon T, Dadgar J, et al. Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(50):30134—30140.
- [32] Fagerstrom S, Pahlman S, Gestblom C, et al. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells [J]. *Cell Growth Differ*, 1996, 7(6): 775—785.
- [33] Zeidman R, Lofgren B, Pahlman S, et al. PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells[J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(4):713—726.
- [34] Zeidman R, Troller U, Raghunath A, et al. Protein kinase Cepsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(1): 12—24.
- [35] Fazen LE, Ringkamp M. The Pathophysiology of Neuropathic Pain: A Review of Current research and Hypotheses[J]. *Neurosurg Q*, 2007, 17(4):245—262.
- [36] Dib-Hajj SD, Black JA, Cummins TR, et al. Rescue of alpha-SNS sodium channel expression in small dorsal root ganglion neurons after axotomy by nerve growth factor in vivo[J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79(5):2668—2676.
- [37] Lee HL, Lee KM, Son SJ, et al. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(18):2807—2811.
- [38] Senatorov VV, Charles V, Reddy PH, et al. Overexpression and nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a transgenic mouse model of Huntington's disease[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(3):285—297.
- [39] Mazzola JL, Sirover MA. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? [J]. *Neurotoxicology*, 2002, 23(4—5):603—609.
- [40] Kim CI, Lee SH, Seong GJ, et al. Nuclear translocation and overexpression of GAPDH by the hyper-pressure in retinal ganglion cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(4): 1237—1243.
- [41] Yue SW, Zhang Y, Wu ZY. Apoptosis of neurons after lumbar nerve root chronic injury on dorsal root ganglion in rabbits[J]. *The Journal of Cervicodynia and Lumbodynia*, 2003, 1124:342—344.
- [42] Dillmann WH, Mehta HB, Barrieux A, et al. Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71[J]. *Circ Res*, 1986, 59(1):110—114.
- [43] Cizkova D, Carmel JB, Yamamoto K, et al. Characterization of spinal HSP72 induction and development of ischemic tolerance after spinal ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2004, 185(1):97—108.
- [44] Cizkova D, Lukacova N, Marsala M, et al. Experimental cauda equina compression induces HSP70 synthesis in dog[J]. *Physiol Res*, 2005, 54(3):349—356.
- [45] Willis D, Li KW, Zheng JQ, et al. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(4):778—791.
- [46] Sturzenbaum SR, Kille P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 130:281—289.
- [47] Dib-Hajj S, Black JA, Felts P, et al. Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(25):14950—14954.
- [48] Abe M, Kurihara T, Han W, et al. Changes in expression of voltage-dependent ion channel subunits in dorsal root ganglia of rats with radicular injury and pain [J]. *Spine*, 2002, 27(14): 1517—1524; discussion 1525.
- [49] Kang SK, So HH, Moon YS, et al. Proteomic analysis of injured spinal cord tissue proteins using 2-DE and MALDI-TOF MS[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 2797—2812.
- [50] Lee SC, Yoon TG, Yoo YI, et al. Analysis of spinal cord proteome in the rats with mechanical allodynia after the spinal nerve injury[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 2071—2078.