论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0384-03

肿瘤抑制因子PTEN蛋白在成年大鼠中枢神经系统的表达

蔡其燕,姚忠祥 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察PTEN在成年大鼠中枢神经系统(central nervous system, CNS)的表达情况。**方法** 用免疫组织化学ABC法显示大鼠CNS中PTEN阳性免疫反应产物。**结果** PTEN阳性反应产物广泛分布于大鼠的CNS内,阳性细胞的分布主要表现为较多、中等量和少量3种情况,其亚细胞定位包括细胞质、细胞核和细胞质突起。**结论** 明确PTEN在成年大鼠CNS中的表达模式。

关键词: PTEN;中枢神经系统;表达

中图法分类号: R322.81; R329.24; R341 **文献标识码:** A

Expression of tumor suppressor PTEN protein in central nervous system of adult rats

CAI Qi-yan, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics of the phosphatase and tensin homolog deleted on the chromosome 10 (PTEN) in the central nervous system(CNS) of adult rats. **Methods** Immunohistochemical staining was used to demonstrate the PTEN-like positive immunohistochemical product. **Results** Expression of PTEN was extensive in the CNS. The distribution of positive cells was strong, moderate or weak and its subcellular localization included the cytoplasm, nuclei and processes. **Conclusion** The present results identify the expression of PTEN protein in the CNS of adult rats.

Key words: the phosphatase and tensin homolog deleted on the chromosome 10; central nervous system; expression

PTEN(即在10号染色体缺失的磷酸酯酶和tensin类似物)是一种肿瘤抑制基因,具有脂性和蛋白磷酸酶两种活性[1]。许多肿瘤包括子宫内膜癌、黑素瘤和前列腺癌,都发生了该基因的缺失或失活。研究表明,PTEN在神经系统中也具有重要作用,调控着神经细胞的增殖、迁移、分化和凋亡。对脑PTEN的首次报道来自于人活体组织检测,检测发现PTEN在神经元胞体有强免疫染色。在体外培养的小脑颗粒细胞中也可以检测到PTEN mRNA和蛋白质。Lachyanker等[2]在成年小鼠的嗅球、大脑皮质、海马和小脑蒲肯野细胞中观察到PTEN的表达。另有研究报道PTEN蛋白在成年大鼠腰段脊髓和背根节中也有表达[3]。但目前对于PTEN在成年中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的表达和功能少见比较系统的报道。因此,本研究以成年大鼠为研究对象,采用免疫组织化学方法观察大鼠CNS中PTEN的表达模式,为了解PTEN在神经系统中的作用提供形态学基础。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

成年SD大鼠10只,雌雄不拘,体质量200~250 g,由本校实验动物中心提供。PTEN抗体购于Santa Cruz公司,SABC免疫组化试剂盒购于博士德生物有限公司。

1.2 方法

成年大鼠以3%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,用2.5% Zamboni液灌注固定。灌毕,小心剥取鼠脑和脊髓于Zamboni液中,4 ℃后固定24 h,30%蔗糖脱水。OCT包埋,连续冰冻切片(厚30 μm),切片收集于Zamboni液中,4 ℃保存。PTEN免疫组织化学染色步骤如下:0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗切片,3% H_2O_2阻断内源性过氧化物酶15 min, 5% BSA 37 ℃封闭30 min,入一抗(1∶100) 37 ℃孵育3 h,转入4 ℃冰箱2 d。二抗37 ℃孵育4 h, SABC 37 ℃ 1 h, DAB显色,系列酒精脱水,二甲苯透明、中性树胶封片。Olympus显微镜观察、照相,对照切片以0.01 mol/L PBS替代一抗,其余步骤相同,结果为阴性。运用Image-Pro plus 4.5软件对核团阳性细胞

基金项目:国家自然科学基金(30572364)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30572364)

作者简介:蔡其燕(1980-),女,广西壮族自治区柳州市人,硕士研究生,主要从事神经细胞发育与分化调控方面的研究。电话:(023) 68752229

通讯作者:姚忠祥,电话:(023) 68752231,E-mail: yaozhx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-06-26;修回日期:2006-11-15

进行记数。

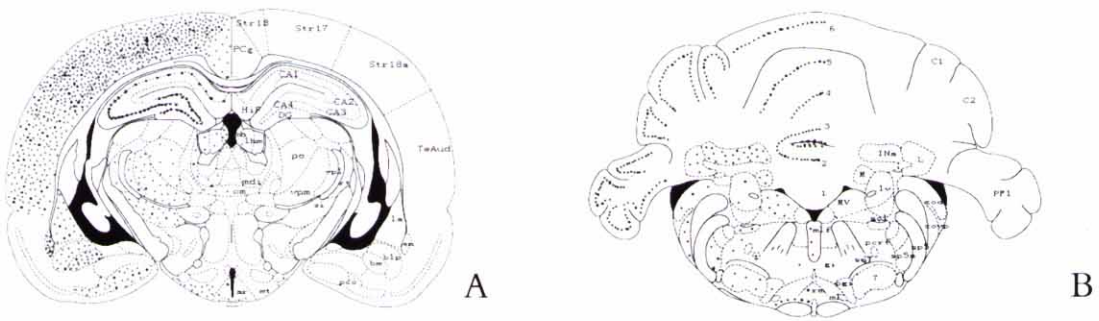
2　结果

免疫组织化学结果显示，PTEN 阳性反应产物广泛分布于大鼠的 CNS 内，包括端脑、大脑、间脑、脑干、小脑和脊髓（表 1，图 1）。阳性细胞的分布主要出现较多（图 2A）、中等量（图 2B、C）和少量（图 2D）3 种情况。多数阳性细胞胞体较大，呈锥形、梭形或椭圆形，染色较深。其亚细胞定位分为细胞质、细胞核和细胞质突起（图 2A、D）；细胞质和细胞核（图 2C）；细胞质和细胞质突起（图 2B）。

表 1　成年大鼠 CNS 内 PTEN 的表达

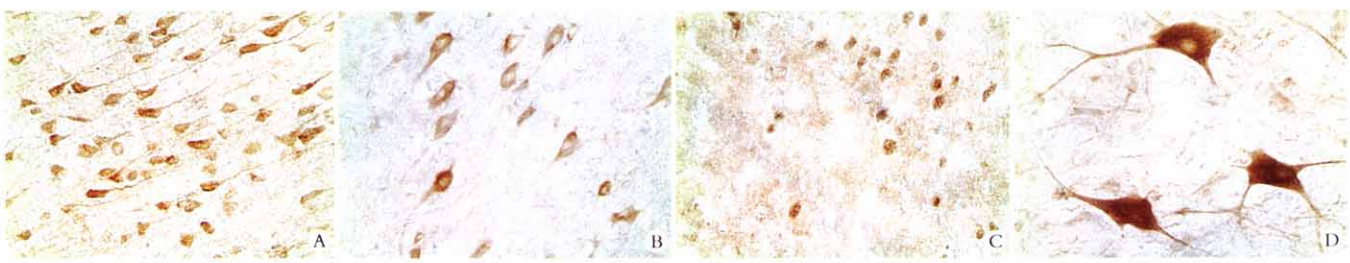
脑区	表达强度	脑区	表达强度	脑区	表达强度	脑区	表达强度	脑区	表达强度	脑区	表达强度
端脑		嗅内皮质	+++	**中脑**		小细胞网状核	+	疑核	+++	齿状回	+++
小钳	+	**间脑**		下丘脑腹内侧核	++	面神经核	++	楔核	++	束状回	+++
屏状核	++	丘脑内侧背核	++	下丘脑背内侧核	++	面神经上核	+	楔束外核	+	海马裂	++
盖带	+++	丘脑外侧背核	++	下丘中央核	+	内侧丘系	+++	薄束核	+	下托	++
尾壳核	+++	丘脑腹内侧核	++	三叉神经中脑核	+++	内侧纵束	++	**小脑**		前下托	+++
伏核	+++	丘脑腹后内侧核	+++	中缝正中核	++	中缝大核	+/−	蚓小叶	+++	旁下托	+++
梨状内核	+++	丘脑腹后外侧核	+++	中缝背核	+++	脑桥网状被盖核	+++	绳状叶脚	+++	**杏仁体**	
视交叉	+	丘脑中央内侧核	++	中央灰质	+++	脑桥网状核	++	小脑顶核	++	杏仁前皮质核	+++
大脑皮质		丘脑菱形核	++	被盖腹侧核	+++	被盖脚桥核	++	小脑间置核	+++	杏仁皮质后核	+++
内侧眶区	+++	丘脑连接核	++	桥核	+++	楔形核	+	小脑外侧核	++	杏仁外侧核	+++
腹侧眶区	+++	丘脑网状核	+	小脑上脚	+	三叉神经感觉根	+	**嗅脑**		杏仁基内侧核	+++
外侧眶区	+++	丘脑室旁核	++	**脑桥**		被盖背外侧核	+++	前嗅核	+++	杏仁基外侧核	+++
边缘前区	+++	丘脑后核	++	前庭神经内侧核	++	前庭神经上核	+	嗅球内丛层	+/−	**隔核**	
中央前区	+++	外侧丘系腹侧核	+++	前庭神经外侧核	+	**延髓**		嗅球外丛层	+/−	隔内侧核	+
颞叶、听区	+++	僵内侧核	+++	孤束核	++	延髓中央网状核	+	嗅球内粒层	++	隔外侧核	++
额叶皮质	+++	僵外侧核	+	蜗神经背侧核	+	延髓线状核	+	**海马**		隔海马核	++
扣带前皮质	+++	未定带	+++	蜗神经腹侧核	++	下橄榄内侧核	++	CA1	++	**脊髓**	
扣带后皮质	++	结节内侧核	+++	三叉神经脊束核	++	外侧网状核	++	CA2	+++	前角	+
感觉运动皮质	+++	弓状核	+	巨细胞网状核	+	旁正中网状核	+	CA3	+++	中间带	+
纹状皮质	+++			旁巨细胞网状核	+	舌下神经核	+	CA4	+++	后角	+

说明：（1）“+”等代表 PTEN 阳性细胞相对数量，+++：较多；++：中等量；+：少量；+/−：偶见；（2）核团命名根据《大鼠脑立体定位图谱》[4]，表中所列核团均为观察到 PTEN 表达的核团，未观察到明显 PTEN 表达的核团未列于表内



A：耳间线前方 4.8 mm；B：耳间线后方 2.4 mm；英文缩写以《大鼠脑立体定位图谱》[4] 为标准，“.”密集程度表示 PTEN 表达强弱

图 1　PTEN 在成年大鼠大脑和小脑的表达



A：颞叶；B：小脑外侧核；C：丘脑内侧背核；D：巨细胞网状核

图 2　免疫组化显示成年大鼠 CNS 内 PTEN 的表达　（SABC ×400）

3 讨论

本研究结果显示 PTEN 在 CNS 内表达广泛，包括端脑、间脑、中脑、脑桥、小脑、延髓、脊髓等，提示 PTEN 可能参与了 CNS 的多种功能，对维持 CNS 的正常活动具有重要作用。

PTEN 是一个高度保守的基因，在人、鼠和狗的 PTEN 有 99.75% 的同源性，表明 PTEN 在细胞生命中起重要作用。但 PTEN 在神经系统内的表达存在种族差异，Tanriover 等[5]研究发现，在人胚胎皮质发育的早期 PTEN 表达较强，此后随着胚胎发育 PTEN 的表达逐渐下降，但某些细胞细胞核 PTEN 的表达始终很强。Lachyankar 等[2]的研究结果显示小鼠在接近出生时才检测到 PTEN 的表达。因此 PTEN 在大鼠 CNS 内的表达可能与在小鼠及人内的表达也存在一定的差异性。

PTEN 是一种磷酸磷脂酰肌醇磷酸酶，它能通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(PI-3K/Akt)信号通路拮抗 PI-3K 的作用，降低 Akt 的活性，负性调节细胞的生存[6]。Lachyankar 等[2]研究发现，在 CNS 内 PTEN 主要在神经元中表达。我们在实验中观察到 PTEN 蛋白在大鼠 CNS 的表达广泛，蒲肯野细胞为强阳性，其他阳性细胞胞体多较大，为锥形、梭形或椭圆形，部分细胞突起明显，因此我们推测 PTEN 作为一种肿瘤抑制因子，可能主要在神经元中表达。之前的研究表明，在肝癌细胞以及成纤维细胞[7]中 PTEN 只在细胞质中表达；Lachyankar 等[2]研究发现神经细胞中 PTEN 阳性反应产物的分布局限于胞体，在突起中没有看到阳性反应产物；而 Perandones 等[8]研究报道在突起中也有 PTEN 的表达。本研究结果显示部分阳性细胞细胞质、细胞核及细胞质突起中都有 PTEN 的表达，部分细胞细胞质和突起有表达，部分细胞细胞质和细胞核中有表达。PTEN 不同的亚细胞定位一方面可能是由于细胞类型的不同，一方面可能是由于不同定位涉及的信号通路不同，除了 PI-3K/Akt 信号通路外，PTEN 还可能通过 FAK、MAPK 等不同的信号通路发挥其调节作用[9]。

Marino 等[10]研究证实胶质前体细胞中 PTEN 的表达很弱，在成熟胶质细胞中检测不到 PTEN 的表达[2]，本研究也很少观察到胶质样细胞明显的阳性反应。PTEN 的缺失使细胞过度增殖，导致肿瘤的发生。神经胶质瘤是发生于 CNS 的一种恶性肿瘤，目前被认为起源于转化的胶质前体细胞[11]，在胶质瘤中通常也检测不到 PTEN 的表达，因此 PTEN 的突变或缺失可能和神经胶质瘤的发生发展有关。但是目前对于神经胶质瘤的发生究竟起源于何种阶段的星形胶质前体细胞、神经胶质瘤的发生是否还伴随着其他基因的突变以及 PTEN 是如何影响神经胶质瘤的发生发展仍不清楚，尚需进一步研究。

综上所述，本研究初步观察了 PTEN 在成年大鼠 CNS 的表达特征，其在 CNS 中表达广泛，除在嗅球、大脑皮质、海马、小脑蒲肯野细胞等得到和研究报道基本一致的结果外，还发现了它在其他核团不同程度的表达，这为进一步研究 PTEN 对神经系统的调控机制奠定了形态学基础。

参考文献：

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

[2] Lachyankar M B, Sultana N, Schonhoff C M, *et al*. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation[J]. J Neurosci, 2000, 20(4): 1404-1413.

[3] 严志强，张沛云，王晓冬，等. 肿瘤抑制因子 PTEN 蛋白在成年大鼠腰段脊髓和背根节中的表达与分布[J]. 解剖学报，2002，33(6)：587-589.

[4] 包新民，舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京：人民卫生出版社，1991：4-97.

[5] Tanriover G, Demir N, Pestereli E, *et al*. PTEN-mediated Akt activation in human neocortex during prenatal development[J]. Histochem Cell Biol, 2005, 123(4-5): 393-406.

[6] Goberdhan D C, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(Spec 2): R239-R248.

[7] Gu J, Tamura M, Yamada K M. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways[J]. J Cell Biol, 1998, 143(5): 1375-1383.

[8] 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.

[9] Weng L P, Brown J L, Baker K M, *et al*. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(15): 1687-1696.

[10] Marino S, Krimpenfort P, Leung C, *et al*. PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumourigenesis in the cerebellum[J]. Development, 2002, 129(14): 3513-3522.

[11] Holland E C, Hively W P, Depinho R A, *et al*. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G_1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice[J]. Genes Dev, 1998, 12(23): 3675-3685.

（编辑 龙 亮）