DOI:10.16016/j.1000-5404.201606173

人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因敲除促进小鼠动脉血管钙化的机制研究

邓 亮[1],黄 璐[2],刘 畅[3] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:消化内科[1],重症医学科[3];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童感染免疫重庆市重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10,PTEN)在小鼠动脉血管钙化形成过程中的作用。**方法** ①构建血管特异性PTEN敲除小鼠($PTEN^{\Delta/\Delta}$),对照组小鼠为$PTEN^{f/f}$;②免疫组化检测ApoE全敲除小鼠钙化血管中PTEN的表达水平;③体外通过钙化培养基诱导血管钙化;④Alizarin Red染色和Von Kossa染色评估PTEN敲除后小鼠血管钙化程度;⑤实时荧光定量PCR检测血管钙化标志物Runx2、骨钙蛋白和BMP2的表达水平。**结果** ①与普通饮食组相比,高脂饮食诱导的ApoE基因敲除小鼠血管钙化明显,而钙化后的血管中PTEN的表达水平显著下降($P<0.01$);②经体外诱导后,$PTEN^{\Delta/\Delta}$小鼠血管明显钙化,而$PTEN^{f/f}$小鼠血管几乎无钙化;③与$PTEN^{f/f}$组相比,$PTEN^{\Delta/\Delta}$小鼠血管钙化标志物Runx2、骨钙蛋白和BMP2的表达均明显升高($P<0.05$)。**结论** 血管特异性PTEN基因敲除促进小鼠血管钙化的形成。

[关键词] 动脉血管钙化;PTEN;Runx2;骨钙蛋白;BMP2
[中图法分类号] R-332;R394.3;R543.5 [文献标志码] A

Muscle-specific deletion of PTEN promotes vascular calcification in mice

Deng Liang[1], Huang Lu[2], Liu Chang[3] ([1]Department of Gastroenterology, [3]Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Key Laboratory of Pediatric Infection and Immunology, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) in mice vascular calcification. **Methods** Conditional deletion of PTEN in mice ($PTEN^{\Delta/\Delta}$) was generated by crossing PTEN exon 5 floxed mice ($PTEN^{f/f}$) with the SM22α-$Cre^{+/-}$ transgenic mice. PTEN expression was detected by immunohistochemical staining in apolipoprotein E ($ApoE^{-/-}$) mice fed by high fat diet (HFD) or chow diet (CD). Aortic rings excised from 4-week-old $PTEN^{\Delta/\Delta}$ mice were cultured in calcified media. After 3 weeks *ex vivo* culture, arterial calcification was determined by Alizarin Red staining and Von Kossa staining in $PTEN^{\Delta/\Delta}$ and control $PTEN^{f/f}$ mice. The expression of runt related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) were detected by real-time PCR in both mice groups. **Results** Compared to CD fed group, HFD induced vascular calcification in $ApoE^{-/-}$ mice while PTEN expression was significantly decreased in the calcified arteries ($P<0.01$). Immunostaining demonstrated obvious vascular calcification in $PTEN^{\Delta/\Delta}$ mice after *ex vivo* stimulated culture, which was not evident in $PTEN^{f/f}$ mice under the same condition. Furthermore, elevated mRNA expression of Runx2, osteocalcin and BMP2 was detected in $PTEN^{\Delta/\Delta}$ mice compared with $PTEN^{f/f}$ mice by PCR analysis ($P<0.05$). **Conclusion** Muscle-specific deletion of PTEN promotes vascular calcification in mice.

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81400612)
[通信作者] 刘 畅,E-mail:36032267@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.029.html

[**Key words**] vascular calcification; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; Runx2; osteocalcin; bone morphogenetic protein 2

Supported by the National Nature Science Foundation for Young Scholars of China (81400612). Corresponding author: Liu Chang, E-mail: 36032267@qq.com

动脉粥样硬化是导致多种心血管疾病的一个十分重要的因素,主要表现为血管内膜重建、硬变、损伤导致的血管狭窄,而血管钙化是动脉粥样硬化进展后期的突出表现,是心血管疾病的死亡预测因子[1]。人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)是一种蛋白/脂肪磷酸酶,为抑癌基因,是蛋白激酶B(protein kinase B, PKB,又称AKT)上游的调节蛋白之一,可以负向调控AKT的活化[2]。研究证实AKT的活化可能参与血管钙化或动脉粥样硬化的形成[3]。文献[4-5]报道,部分敲除PTEN基因或通过化学药物诱导PTEN的过表达可以抑制动脉粥样硬化的进展。然而,目前尚少见血管特异性PTEN敲除在动脉血管钙化作用的研究。本研究主要建立血管特异性PTEN基因敲除小鼠,以研究PTEN在动脉血管钙化中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

$PTEN^{f/f}$小鼠、SM22α $Cre^{+/-}$小鼠、$ApoE^{-/-}$小鼠均购自美国Jackson Laboratory;TRIzol™试剂、RNA酶抑制剂、MMLV、Oligo(dt)和实时荧光定量PCR混合液均购自美国Invitrogen公司;PTEN抗体购自美国Cell Signaling Technology(9552);Alizarin Red S溶液(pH 4.2)和β-甘油磷酸盐购自美国Sigma-Aldrich公司;DMEM培养基购自美国Invitrogen公司;引物定制于生工生物工程(上海)股份有限公司;实时荧光定量PCR分析仪购自Bio-Rad公司。

1.2 血管特异性PTEN基因敲除小鼠的构建方法[6]

PTEN 5号外显子标记的C57BL/6小鼠($PTEN^{f/f}$)与SM22α $Cre^{+/-}$转基因C57BL/6小鼠进行杂交,以获得$PTEN^{f/f}$ $Cre^{-/-}$($PTEN^{f/f}$)小鼠和$PTEN^{f/f}$ $Cre^{+/-}$($PTEN^{\Delta/\Delta}$)小鼠,SM22α $Cre^{+/-}$基因主要于血管内表达,5号外显子为PTEN磷酸酶编码区域,为PTEN的功能片段,故$PTEN^{\Delta/\Delta}$为血管特异性PTEN基因敲除。

1.3 ApoE全基因敲除小鼠的喂养

8周龄ApoE全基因敲除($ApoE^{-/-}$)小鼠分为对照组和高脂饮食组,每组7只。对照组用普通饲料喂养,高脂饮食组用高脂饲料(含21.2%的脂肪和0.2%的胆固醇,Harlan Teklad饲料,TD88137)喂养,30周后取其主动脉弓,用于Alizarin Red染色和PTEN免疫组化染色。

1.4 离体血管培养

由于大部分$PTEN^{\Delta/\Delta}$小鼠于30 d内死亡,通过体内实验获得血管钙化模型周期至少>6个月,因此只能通过培养4周龄左右的小鼠主动脉进行体外实验评估PTEN敲除后对动脉血管钙化的影响。

将小鼠胸主动脉于无菌条件下分离,无菌PBS冲洗3次,于显微镜下将动脉外膜剥离,并将血管切成3~4 mm长,将其培养于加有1%胎牛血清的钙化培养基中(DMEM中含0.25 mmol/L维生素C和10 mmol/L β-甘油磷酸盐),培养3周后取血管切片用于HE染色、Alizarin Red染色和Von Kossa染色。

1.5 Alizarin Red染色

将冰冻切片组织放置于4%多聚甲醛中于室温下固定10 min,双蒸水清洗2~3次,用2% Alizarin Red染料进行着色10~20 s,双蒸水清洗2~3次,于显微镜下观察拍照。

1.6 Von Kossa染色

将冰冻切片组织放置于4%多聚甲醛中于室温下固定10 min,双蒸水清洗2~3次,用5%硝酸银溶液着色30 min,双蒸水清洗1次,于显微镜下观察拍照。

1.7 免疫组化

将临近于Alizarin Red染色前后3张的冰冻切片组织放置于4%多聚甲醛中固定10 min,PBS清洗后置于0.3%的过氧化氢甲醇溶液中30 min,PBS清洗,0.3% Triton X-100浸泡30 min,PBS清洗,PTEN一抗(1∶400)4 ℃孵育过夜,PBS清洗,加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育2 h,PBS清洗,加入显色液15~30 min,进行免疫组织化学显色,封片,拍照。

1.8 实时荧光定量PCR

用TRIzol提取主动脉组织总RNA,紫外分光光度计检测其纯度和浓度。采用合格的RNA标本,按M-MLV逆转录酶说明书逆转录合成cDNA。然后以SYBR Green Ⅰ作为荧光标记物,荧光定量PCR扩增mRNA。Runt相关转录因子2(Runt related transcription factor 2, Runx2)上游引物:5′-CGGCCCTCCCTGAACTCT-3′,下游引物:5′-TGCCTGCCTGGGATCTGTA-3′;骨钙蛋白上游引物:5′-TGCTTGTGACGAGCTATCAG-3′,下游引物:5′-GAGGACAGGGAGGATCAAGT-3′;骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)上游引物:5′-TGACTGGATCGTGGCACCTC-3′,下游引物:5′-CAGAGTCTGCACTATGGCATGGTTA-3′;GAPDH的上游引物:5′-AACACGGAAGGC-

CATGCCAG-3′,下游引物:5′-TGCATCCTGCACCAC-CAACT-3′。实时定量 PCR 仪循环设置:95 ℃ 10 min 预变性,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,进行 40 个循环。进行反应后通过扩增曲线和熔解曲线分析,$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行相对定量。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,$P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血管钙化后 PTEN 的表达明显下降

8 周龄 $ApoE^{-/-}$小鼠通过高脂饮食喂养 30 周后取主动脉根部,通过 Alizarin Red 染色评估血管钙化程度。用 Image J 分析软件评估血管内钙沉积区域和 PTEN 表达区域的所占比例。与对照组相比,高脂饮食组主动脉根血管内钙盐沉积明显增多,血管钙化面积比为对照组的3.5 倍[(13.10 ± 1.86)% *vs* (3.73 ± 1.42)%,$P=0.002$]。同时,用钙化血管切片前后的 3 张空白切片行免疫组化评估 PTEN 的表达情况,结果显示,高脂饮食组血管钙化后 PTEN 的表达较对照组明显下降[(18.70 ± 2.83)% *vs* (47.86 ± 3.75)%,$P<0.01$]。结果见图 1。

2.2 血管特异性 PTEN 敲除促进血管钙化

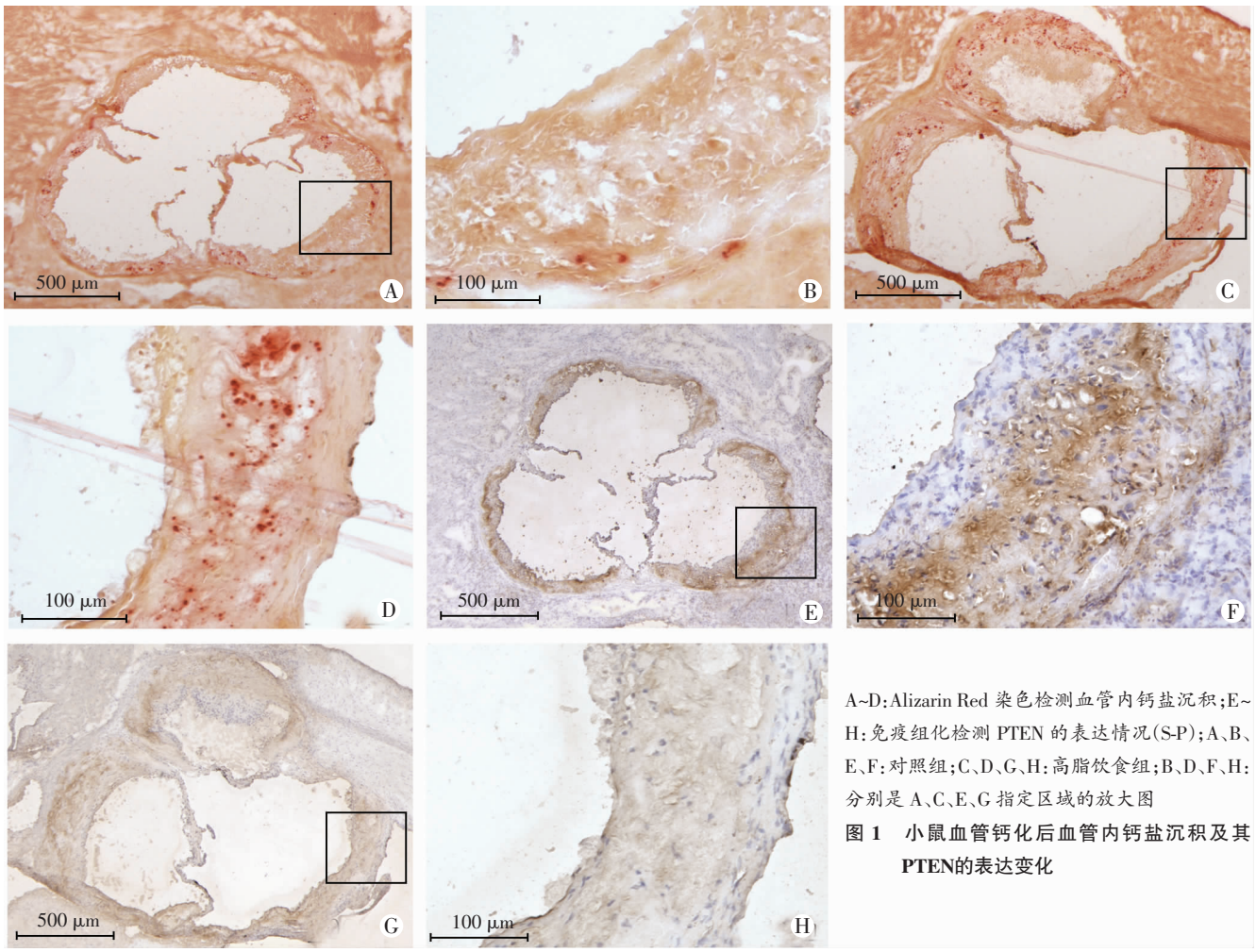
5 对 4 周龄 $PTEN^{\triangle/\triangle}$与 $PTEN^{f/f}$小鼠主动脉于钙化培养基中体外生长 3 周后,通过 Alizarin Red 染色和 Von Kossa 染色评估钙化程度,如图 2 所示,PTEN 敲除的主动脉几乎全血管钙化,而对照组血管未见明显钙化。

2.3 血管特异性 PTEN 敲除促进钙化标志物的表达

如表 1 所示,PTEN 敲除后,主动脉组织内血管钙化标志物 Runx2、骨钙蛋白和 BMP2 的表达均升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 血管特异性 PTEN 敲除后钙化标志物的表达水平
($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

钙化标志物	$PTEN^{f/f}$	$PTEN^{\triangle/\triangle}$	*P* 值
Runx2	1.00 ± 0.00	1.71 ± 0.23	0.035
骨钙蛋白	1.00 ± 0.00	2.23 ± 0.65	0.031
BMP2	1.00 ± 0.00	2.59 ± 0.31	0.028



A~D:Alizarin Red 染色检测血管内钙盐沉积;E~H:免疫组化检测 PTEN 的表达情况(S-P);A、B、E、F:对照组;C、D、G、H:高脂饮食组;B、D、F、H:分别是 A、C、E、G 指定区域的放大图

图 1 小鼠血管钙化后血管内钙盐沉积及其 PTEN的表达变化

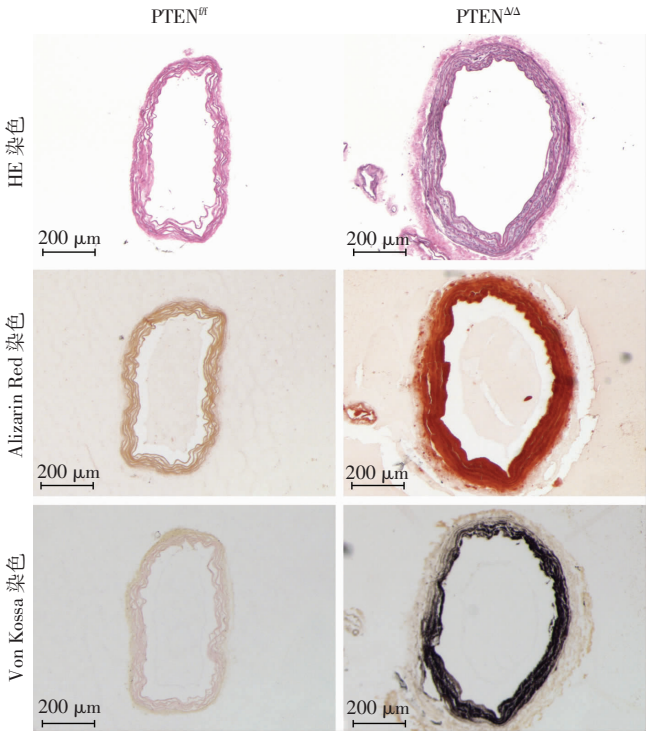


图 2 血管特异性 PTEN 敲除促进动脉血管钙化病理学观察

3 讨论

PTEN 作为一个蛋白/脂质磷酸酶在不同细胞中发挥不同功能,主要表现为抑癌作用,PTEN 在动脉粥样硬化中可能发挥一定作用,如在剪切力介导的大鼠血管内膜增生模型中,过表达 PTEN 可以减轻血管内膜增生和炎症因子的浸润[1,4];另外,诱导 PTEN 过表达可以抑制家兔动脉粥样硬化模型中血管平滑肌细胞的增殖和迁移,从而抑制血管动脉粥样硬化[5]。但也有研究表明,部分敲除 PTEN 基因对高脂饮食诱导 $ApoE^{-/-}$ 小鼠形成动脉粥样斑块没有抑制作用[1]。以上研究均提示 PTEN 可能在血管动脉粥样硬化中发挥作用,但目前仍存在一定的矛盾及争议,且并无 PTEN 全基因敲除或组织特异性敲除后的研究论证其在血管动脉粥样硬化中的作用,因此,我们通过构建血管特异性敲除 PTEN 5 号外显子的小鼠模型来验证我们的设想。

高脂饮食喂养 $ApoE^{-/-}$ 敲除小鼠是制造动脉粥样硬化模型的重要方法之一。为了解 PTEN 在动脉粥样硬化中的作用,我们用高脂饲料喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠后取动脉粥样硬化血管进行研究,发现其动脉血管钙化更为严重,并且 PTEN 表达明显下降,提示 PTEN 可能是动脉血管钙化形成过程中的一个重要调控蛋白,因此我们通过 Cre-LoxP 重组酶技术构建血管特异性 PTEN 基因敲除小鼠进一步研究其作用和重要性,结果显示血管特异性 PTEN 敲除后动脉血管严重钙化,几乎累及全血管,说明 PTEN 缺失或表达降低对动脉血管钙化形成起着十分关键的作用。

血管钙化主要为动脉粥样硬化形成过程中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)向成骨细胞分化后的结局,BMP2、骨钙蛋白和 Runx2 均是诱导 VSMC 向成骨细胞分化的重要调节蛋白[7]。BMP 家族已被证实在血管生理过程中发挥重要作用。文献[8-10]报道在动脉粥样硬化斑块中发现了大量 BMP2 的存在,另外研究证实 BMP2 可以促进 VSMC 向成骨细胞转化,诱发血管钙化。Runx2 是一个多功能转录蛋白,其在调节干细胞向成骨细胞分化中起着重要作用,同时,Runx2 还能诱导成骨细胞标志蛋白的表达,如骨钙蛋白、胶原蛋白、BMP2 等[11-12]。本研究发现血管特异性 PTEN 敲除后 BMP2、骨钙蛋白和 Runx2 均显著升高,提示 PTEN 敲除后可能通过调控 VSMC 向成骨细胞分化促进血管钙化。

PTEN 是 AKT 上游的调节蛋白,可以负向调控 AKT 的活化,而大量研究均证实 AKT 参与动脉血管钙化形成,同时 AKT 可以上调 Runx2 的表达,Runx2 是一个重要的转录蛋白,可以促进 VSMC 向成骨细胞分化[3,13-15]。因此,本研究提示 PTEN 是动脉血管钙化形成过程中一个重要的调控蛋白,可能通过调控 AKT/Runx2 信号通路而发挥作用,但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Bennett M R, Sinha S, Owens G K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 692-702. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361

[2] Leslie N R, Kriplani N, Hermida M A, *et al*. The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(1): 273-278. DOI: 10.1042/BST20150224

[3] Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function[J]. Vascul Pharmacol, 2015, 74: 38-48. DOI:10.1016/j.vph.2015.05.008

[4] Koide S, Okazaki M, Tamura M, *et al*. PTEN reduces cuff-induced neointima formation and proinflammatory cytokines[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H2824-H2831. DOI:10.1152/ajpheart.01221.2006

[5] Chen W J, Lin K H, Lai Y J, *et al*. Protective effect of prop-

ylthiouracil independent of its hypothyroid effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits: PTEN induction and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Circulation, 2004, 110(10): 1313 - 1319. DOI:10.1161/01.CIR.0000140764.15398.F3

[6] Lesche R, Groszer M, Gao J, *et al*. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene[J]. Genesis, 2002, 32(2): 148 - 149. DOI:10.1002/gene.10036

[7] Thompson B, Towler DA. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8(9): 529 - 543. DOI:10.1038/nrendo.2012.36

[8] Zhao Y G, Meng F X, Li B W, *et al*. Gelatinases promote calcification of vascular smooth muscle cells by up-regulating bone morphogenetic protein-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(2): 287 - 293. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.067

[9] Zhang M, Sara J D, Wang F L, *et al*. Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14(1): 1 - 9. DOI:10.1186/s12933-015-0214-3

[10] Derwall M, Malhotra R, Lai C S, *et al*. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis.[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2012, 32(3): 613 - 622. DOI:10.1161/ATVBAHA.111.242594

[11] Ruffenach G, Chabot S, Tanguay V F, *et al*. Role for RUNX2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016. DOI:10.1164/rccm.201512-2380OC

[12] Bastos Gon alves F, Vo te M T, Hoeks S E, *et al*. Calcification of the abdominal aorta as an independent predictor of cardiovascular events: a meta-analysis[J]. Heart, 2012, 98(13): 988 - 994. DOI:10.1136/heartjnl-2011-301464

[13] Pal S N, Golledge J. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory[J]. J Atheroscler Thromb, 2011, 18(7): 551 - 559. DOI:10.5551/jat.8656

[14] McCarty M F, DiNicolantonio J J. The molecular biology and pathophysiology of vascular calcification[J]. Postgrad Med, 2014, 126(2): 54 - 64. DOI:10.3810/pgm.2014.03.2740

[15] Sun Y, Byon C H, Yuan K, *et al*. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification[J]. Circ Res, 2012, 111(5): 543 - 552. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.112.267237

(收稿:2016-06-29;修回:2016-09-26)

(编辑 邓强庭)