基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0648-04

抑癌基因 PTEN 随增龄在大鼠肾脏组织的表达

陈俊香[1],蔡广研[2],陈香美[2],卓 莉[1],马 强[2],师锁柱[2],刘伏友[1]
(1.中南大学湘雅二医院肾内科,长沙 410011;2.中国人民解放军总医院肾内科,北京 100853)

【摘 要】目的:研究与张力蛋白同源、第 10 号染色体缺失的磷酸酶基因(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10,PTEN)随增龄在大鼠肾组织内表达的变化,并探讨其在肾脏衰老中的作用。方法:分别留取 3、12、24 月龄 Wistar 大鼠肾组织(n=6),石蜡切片 CD34 免疫组化染色观察肾组织微血管生成;western blot 和免疫组化染色检测大鼠肾组织 PTEN 表达。结果:western blot 显示,随增龄大鼠肾组织蛋白表达水平逐渐升高,24 月龄大鼠表达水平显著高于 3,12 月龄大鼠(P<0.05);免疫组化显示 PTEN 在大鼠肾小球和肾小管均有表达,24 月龄大鼠肾小球和肾小管阳性面积百分比均显著高于 3、12 月龄大鼠(P<0.05)。随增龄大鼠肾组织内出现微血管生成障碍,24 月龄大鼠肾小球毛细血管和管周毛细血管密度均显著低于 3、12 月龄大鼠(P<0.05);相关分析显示,二者与大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达水平均呈负相关(r=-0.761 和 -0.613,P<0.05)。结论:随增龄大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达呈现上升趋势,可能通过影响血管生成参与肾脏衰老过程。

【关键词】PTEN;肾脏;衰老
【中国图书分类法分类号】R572.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-26

Alteration of the expression of PTEN in rats with aging

CHEN Jun-xiang, et al
(*Department of Nephrology, the Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the alteration of the expression of PTEN in rats with aging. *Methods*: Wistar rats were divided into 3 groups: 3-month-old group, 12-month-old group and 24-month-old group (n=6). Immunohistochemistry of CD34 was employed to detecte angiogenesis in the kidneys with aging. The protein expression of PTEN was examined by Western Blot. Immunohistochemistry was also employed to detect the expression of PTEN in the kidneys with aging. *Results*: (1)Compared with 3-month-old rats and 12-month-old rats, the level of PTEN protein expression in kidneys of 24-month-old rats was higher than that of 3-month-old rats and 12month-old rats, as examined by Western Blot (P<0.05); (2) With aging, the positive percentages of PTEN expression in the kidneys were increased, as detected by Immunohistochemistry(P<0.05); (3) With aging, impaired angiogenesis was found in renal tissues of Wistar rats. At the age of 24 months, the glomerular

作者介绍:陈俊香(1974-),女,主治医师,博士,
研究方向:肾脏衰老和肾小球疾病。
通讯作者:蔡广研,男,副教授,E-mail:caiguangyan@sina.com。
基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2007CB507400);国家自然科学基金(编号:30070288,30270505)。

interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic ewing's sarcoma[J].Cancer Res,2005, 65(19):8984-8992.

[6] Chansky H A,Barahmand-Pour F,Mei Q,et al.Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro[J].J Orthop Res,2004,22:910-917.

[7] Riggi N,Cironi L, Suva M L,et al. Sarcomas:genetics,signalling, and cellular origins. Part 1:The fellowship of TET[J]. J Pathol,2007,213: 4-20.

[8] Riggi N,Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma [J].Cancer Lett,2007,254(1):1-10.

[9] Navarro D,Agra N,Pestaña A, et al. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription [J].Carcinogenesis, 2010,31(3):394-401.

[10] Erkizan H V,Kong Y,Merchant M,et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma[J].Nat Med,2009,15(7):750-756.

[11] Tirado O M,Mateo-Lozano S,Villar J,et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells[J].Cancer Res,2006,66 (20):9937-9947.

[12] Staege M S,Gorelov V,Bulankin A,et al.Stable transgenic expression of IL-2 and HSV1-tk by single and fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes[J].Pediatr Hematol Oncol,2003,20(2):119 -140.

[13] Meyer-Wentrup F, Richter G, Burdach S. Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope[J]. Pediatr Hematol Oncol,2005,22(4):297-308.

(责任编辑:冉明会)

capillary density and the peritubular capillary density were lower than that of 3-month-old rats and 12-month-old rats ($P<0.05$), which were correlated negatively with the protein expression of PTEN in kidneys ($r=-0.761$ and -0.613, $P<0.05$). *Conclusion*: PTEN could promote age-related renal insenecence through affecting angiogenesis.

【Key words】PTEN; Kidney; Aging

肾脏衰老是机体衰老的重要组成部分,其发生发展机制尚不清楚。研究表明,随增龄肾脏出现微血管生成障碍,主要表现为局灶性肾小管周及肾小球毛细血管密度减少,肾小球毛细血管床面积减少,管腔闭塞[1]。与张力蛋白同源、第 10 号染色体缺失的磷酸酶基因(Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10, PTEN)是一种抑癌基因,其编码蛋白具有脂质磷酸酶和蛋白质磷酸酶双重磷酸酶活性,是 1 种细胞内固有表达的非分泌型蛋白,广泛表达于中枢神经系统、心脏、肝脏、肾脏、胃肠道及皮肤等全身多个器官。在肾脏,PTEN 在肾小球、肾小管、鲍曼氏囊及血管中均有表达[2]。文献报道,PTEN 抑制血管生成,其突变或表达下调,血管生成增加[3-6];PTEN 参与细胞[7]和机体的衰老过程[8,9]。然而,肾脏衰老过程中 PTEN 的表达变化如何? 其与肾脏衰老的关系怎样? 目前国内外文献报道甚少。本研究利用 Wistar 大鼠构建增龄性肾脏衰老模型,观察不同月龄大鼠肾组织 PTEN 的表达变化规律,并探讨其在肾脏衰老过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

雄性 Wistar 大鼠(由解放军总医院实验动物中心提供)18 只,随机分为 3 组(3 月龄组、12 月龄组和 24 月龄组),每组各 6 只。常规条件下分笼饲养,保持 12 h 昼夜循环,室温控制在 27℃左右,湿度维持在 40% ~ 50%,自由进水、进食。饲养至 3 月、12 月、24 月龄处死。2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,腹正中切口,暴露分离双侧肾脏,原位灌洗后摘下双肾,其中一肾立即置于液氮冷冻后 -70℃保存,备提蛋白质。另一肾置于 10%甲醛固定 48 h,石蜡包埋切片用于免疫组化染色。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 PTEN 小鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),CD34 羊多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),PMSF、aprotinin、leupeptin(德国 Sigma 公司),Micro BCA Protein 试剂盒(美国 Pierce 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(美国 SantaCruz 公司),ECL 显色试剂(美国 Santa Cruz)。

1.2.2 Western Blot 检测 PTEN 蛋白的表达 取大鼠肾组织 100 mg,按体积比 1:3,用预冷的 RIPA 裂解液(含 50 mmol/L Tris pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Np-40, 0.1%SDS, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF 及蛋白酶抑制剂 2 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml leupeptin)进行组织匀浆,冰浴 30 min,4℃ 12 000 r/min 离心 25 min,吸取中间层液体即为组织总蛋白。BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。取其中 100 μg 总蛋白加 2 × 十二烷基硫酸钠 95℃变性 5 min, 10 %SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶)电泳,转移至硝酸纤维素膜,10%脱脂牛奶封闭过夜,小鼠抗 PTEN 抗体(1:500)室温孵育 4 h, 0.05%TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 1:2 000),室温孵育 1 h, 0.05%TBST 洗膜 3 次,ECL 显影。以 β-Actin 为内参照,用 ALPHAIMAGER 2200 凝胶图像分析系统,进行半定量分析。

1.2.3 免疫组织化学染色

1.2.3.1 免疫组化检测 PTEN 表达 3 μm 石蜡切片,脱蜡至水。3%过氧化氢(H_2O_2)室温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。胰酶修复抗原。正常山羊血清室温封闭 10 分钟,倾去血清。滴加 1:50 PTEN 小鼠多克隆抗体 4℃过夜,再依次滴加生物素标记二抗和辣根酶标记链酶卵白素分别室温孵育 40 min。DAB 显色。苏木素复染,升梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每次染色均设以 PBS 缓冲液代替一抗的阴性对照。PTEN 抗原表达阳性区被染成棕黄色。结果采用 Image-Pro Plus 图文分析系统,光镜下(10 × 20)每张切片随机选取 10 个肾小球或 10 个视野肾小管 - 间质,测定每个肾小球内或视野内肾小管阳性着色面积与该肾小球和视野中肾小管间质面积的百分比,取其均值作为阳性表达结果(%)。

1.2.3.2 CD34 免疫组织化学染色观察肾脏微血管生成 染色方法与 PTEN 类似。结果分析参考文献[10]。CD34 抗原表达阳性区被染成棕黄色。光镜下(10 × 40)每张切片随机选取 10 个横断面通过血管极的肾小球,摄片,计算每个肾小球毛细血管袢数与肾小球面积比,取其均值作为衡量肾小球微血管密度的指标;光镜下(10 × 20)每张切片随机选取 10 个不含肾小球的肾小管 - 间质的视野,摄片,计算管周毛细血管数与该视野面积比,取其均值作为衡量管周微血管密度(MCV)的指标。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,所有计量资料使用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组的比较采用了单因素方差分析差异,3、12、24 月龄之间的两两比较采用方差分析后的 Bonferroni 检验。肾组织 PTEN 蛋白表达水平与肾小球和肾小管周微血管密度的关系采用直线相关分析。$P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

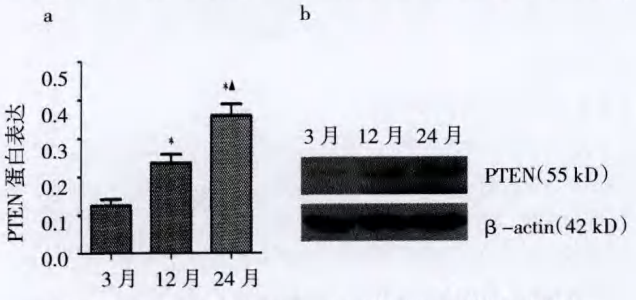
2 结 果

2.1 大鼠肾组织随增龄 PTEN 蛋白表达

Wstern blot 结果显示，随增龄大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达逐渐升高；24 月龄时，PTEN 蛋白水平显著高于 3、12 月龄大鼠（$P<0.05$）。见图 1a、b。

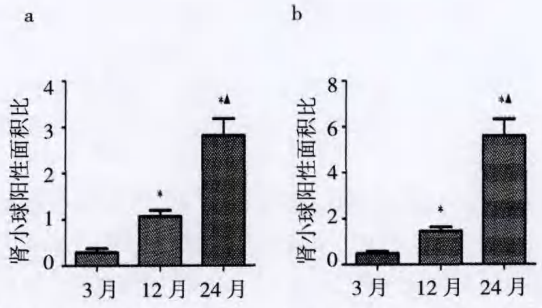
2.2 大鼠肾组织随增龄 PTEN 免疫组化染色

PTEN 主要表达在肾小球系膜细胞、内皮细胞和肾小管上皮细胞胞浆，表现为棕黄色颗粒状物质沉积。阴性对照无表达。随增龄，大鼠肾小球和肾小管阳性面积百分比逐渐升高，3、12、24 月龄大鼠肾小球和肾小管阳性面积百分比分别为 0.287% ± 0.087%、1.064% ± 0.139%、2.812% ± 0.362% 和 0.482% ± 0.094%、1.449% ± 0.180%、5.580% ± 0.727%；24 月龄时，大鼠肾小球和肾小管阳性表达面积比均显著大于 3、12 月龄大鼠（P 均 <0.05）。见图 2、3。



*P<0.05, 与 3 月龄大鼠相比；▲P<0.05, 与 12 月龄大鼠相比

图 1 大鼠肾组织随增龄 PTEN 表达



注：*P<0.05, 与 3 月龄大鼠相比；▲P<0.05, 与 12 月龄大鼠相比

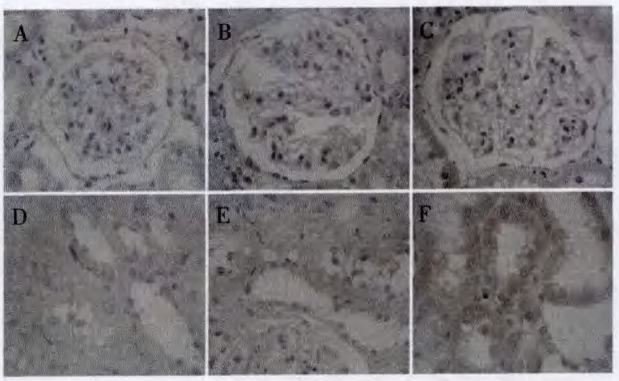
图 3 大鼠肾组织随增龄 PTEN 免疫组化染色阳性面积百分比

2.3 大鼠肾组织随增龄微血管生成

CD34 是一种跨膜糖蛋白，表达于血管内皮细胞膜。结果显示，随增龄，大鼠肾小球和肾小管周微血管密度逐渐降低，3、12、24 月龄大鼠肾小球和肾小管周微血管密度分别为 28.138% ± 3.004%、23.824% ± 3.583%、13.266% ± 1.930% 和 13.264% ± 1.611%、11.936% ± 2.20%、8.560% ± 1.523%；24 月龄时，大鼠肾小球和肾小管周微血管密度均显著小于 3、12 月龄大鼠（P 均 <0.05）。见图 4。

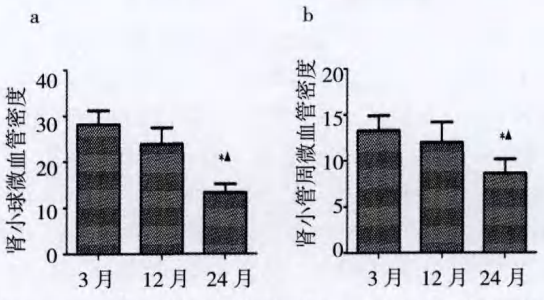
2.4 相关性分析

相关性分析显示，肾组织 PTEN 蛋白表达水平与肾小球和肾小管周微血管密度呈负相关关系，相关系数分别为 −0.761（$P<0.05$）和 −0.613（$P<0.05$）。



注：A 和 D、B 和 E、C 和 F 分别指 3、12、24 月龄大鼠（× 400）

图 2 大鼠肾组织随增龄 PTEN 免疫组化



注：*P<0.05, 与 3 月龄大鼠相比；▲P<0.05, 与 12 月龄大鼠相比

图 4 大鼠肾组织随增龄微血管生成

3 讨 论

衰老是所有生命的自然进程，人类许多疾病的发生、发展都与脏器衰老息息相关。肾脏衰老是机体衰老的重要组成部分，形态学特征主要表现为局灶性肾小球硬化、肾小管萎缩、间质纤维化及炎细胞浸润[11]，其发生发展机制尚未清楚。因此，阐明肾脏衰老的发生发展机制具有重要的社会和医学意义。

众所周知，正常血液循环是所有脏器维持正常功能和新陈代谢的必要前提。肾脏是高度血管化的器官，平均每克器官重量接受的血流位居人体所有脏器的第 1 位，因此肾脏脉管系统的任何改变都可能影响肾功能。众多病理学研究发现，局灶性肾小球硬化可表现为肾小球毛细血管襻闭塞，间质纤维化可伴有肾小管周围毛细血管丧失[12]。近来在残余肾模型中证实，肾脏病变的进展与血管生成障碍、毛细血管丧失密切相关[10]，提示微血管网可能在肾脏疾病发生、发展过程中起重要作用。当肾脏衰老时，有研究发现血管形成存在异常，表现为局灶性肾小管周围及肾小球毛细血管密度减少[13]，进而导致肾小管易缺血、肾小球表面积减少，肾单位缺失；而残余肾单位高滤过、高压力、肥大，最终硬化[14]。我们研究也证实，随增龄，大鼠肾小球和肾小管周微血管密度下降；24 月龄时，大鼠肾小球和和肾小管周微血管密度均显著小

于 3、12 月龄大鼠。提示肾脏增龄性微血管生成障碍参与肾脏衰老过程。

研究表明,在肾脏病变中所发生的血管生成障碍与促血管生成因子(如 VEGF、bFGF、HGF 等)的减少和抗血管生成因子(如 Angiostatin、Endostatin、TSP-1)的增多有关[15]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growht factor,VEGF)是重要的促血管生成因子,VEGF 主要与其受体 Flk-1 结合,启动细胞内信号传导,促进内皮细胞增殖、迁移和血管形成[16]。我实验室张雪光等[17]报道随增龄,大鼠肾组织 VEGF 表达逐渐减少;衰老大鼠肾组织内微血管含量减少与 VEGF 减少密切相关。

PTEN 是一种抑癌基因,其编码蛋白是由 1 209 个核苷酸编码 403 个氨基酸组成的多肽链,具有脂质磷酸酶和蛋白质磷酸酶双重磷酸酶活性,是 VEGF 及 Flk-1 的功能上游因子,其表达上调抑制 VEGF/ Flk-1 的表达。Gomez MC 等[3-6]报道在肿瘤细胞中 PTEN 突变、失活或缺失 VEGF 表达上调,血管生成增加。另外,研究表明 PTEN 参与细胞和器官衰老。Pascal 等[7]在细胞复制性衰老研究中发现,PTEN 表达升高,使 PI3P 脱磷酸化,促进 p27kip1 表达,实现 WI38 细胞周期 G1 期阻滞,细胞复制性衰老。Rice 等[9]在动物模型研究发现,随增龄大鼠主动脉总 PTEN 和磷酸化 PTEN 蛋白表达水平明显升高,参与增龄性相关的血管重塑。衰老大鼠和人胃黏膜的 PTEN 基因和蛋白水平均明显升高,黏膜血流量下降,组织缺氧,易于受损[10]。我们研究发现,随增龄大鼠肾组织 PTEN 蛋白表达逐渐升高;24 月龄时,PTEN 蛋白水平显著高于 3、12 月龄大鼠。免疫组化染色显示,PTEN 主要表达在肾小球系膜细胞、内皮细胞和肾小管上皮细胞浆;随增龄,大鼠肾小球和肾小管阳性面积百分比逐渐升高,24 月龄时,大鼠肾小球和肾小管阳性表达面积比均显著大于 3、12 月龄大鼠。进一步相关分析显示,肾组织 PTEN 蛋白表达水平与肾小球和肾小管周微血管密度呈负相关关系。以上结果提示,随增龄肾脏 PTEN 表达上调,可能通过下调 VEGF/ Flk-1 表达,影响增龄性肾脏微血管生成障碍,促进肾脏衰老进程发展。

总之,肾脏衰老是一个非常复杂的生理过程,随着衰老进程,肾脏出现一系列生理、病理和基因表达的变化。我们的研究结果首次证实了随增龄大鼠肾组织 PTEN 表达上调,其可能通过影响肾脏微血管生成,从而参与肾脏器官衰老过程。有关 PTEN 参与肾脏衰老的作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Kang D H,Kim Y G,Andoh T F,et al. Post cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: melioration by vascular endothelial growth factor[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2001,280(4):F727-736.

[2] Gimm O,Attie B T,Lees J A,et al. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development[J]. Hum Mol Genet,2000,9(11):1633-1639.

[3] Gomez M C,Fueyo J,Jiang H,et al. Mechanisms underlying PTEN regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J].Ann Neurol,2003, 53(1):109-117.

[4] Koul D,Shen R,Garyali A,et al. MMAC/PTEN tumor suppressor gene regulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in prostate cancer[J]. Int J Oncol, 2002, 21(3):469-475.

[5] Huang J,Kontos C D.PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects[J].J Biol Chem,2002, 277(13):10760-10766.

[6] Zhou Y J,Xiong Y X,Wu X T,et al. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer[J].World J Gastroenterol,2004,10(21):3225-3229.

[7] Pascala T,Debacq-Chainiaux F,Chrétien A,et al.Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays[J].FEBS Letters, 2005, 579(17):3651-3659.

[8] Rice K M,Kinnard R S,Wright G L,et al.Aging alters vascular mechanotransduction:Pressure-induced regulation of p70S6k in the rat aorta[J].Mechanisms of Ageing and Development,2005,126(11):1213-1222.

[9] Tarnawski A,Pai R,Deng X,et al. Aging gastropathy-novel mechanisms:hypoxia,up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN,and proapoptotic factors[J].Experimental Cell Research,2007,133(6):1938-1947.

[10] Kang D H,Joly A H,Oh S W,et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model. I.Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1[J].J Am Soc Nephrol, 2001,12(7): 1434-1447.

[11] Goldstein R S,Tarloff J B,Hook J B,et al. Age-related nephropathy in laboratory rats[J]. FASEB J,1988,2(7):2241-2251.

[12] Ohashi R,Kitamura H,Yamanaka N.Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats[J]. J Am Soc Nephrol,2000,11(1):47-56.

[13] Kang D H,Anderson S,Kim Y G,et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease[J]. Am J Kidney Dis,2001,37(3): 601-611.

[14] Anderson S. Progressive renal disease: a disorder of renal adaptation[J]. Q J Med,1989,70(263):185-189.

[15] Kang D H,Kanellis J,Hugo C,et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease[J].J Am Soc Nephrol,2002,13(3):806-816.

[16] Napoleone F. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. Endocrine Reviews,2004,25(4):581-611.

[17] 张雪光,陈香美,张 利,等.血管内皮生长因子及其受体随增龄在大鼠肾组织内表达的研究[J].中华老年医学杂志,2003,22(1):25-29.

(责任编辑:冉明会)