

PTEN 及 LGI1 蛋白在鼠脑缺血组织中的表达

邢洪顺¹, 王寿先¹, 王喆¹, 王增武¹, 宋仁兴¹, 于加省^{2*}

摘要: **目的** 探讨 PTEN 及 LGI1 蛋白在鼠脑缺血组织中的表达。 **方法** 用免疫组化 S-P 法检测 60 例不同时间大鼠一侧脑缺血组织中及正常脑组织中 PTEN 及 LGI1 蛋白的表达。 **结果** PTEN 在正常组与缺血组阳性率有显著性差异($\chi^2=8.26$, $P<0.01$); 正常组强阳性率与缺血组强阳性率有显著性差异($\chi^2=20.98$, $P<0.01$); 缺血 1h 组与缺血 4h 组强阳性率有显著性差异($\chi^2=7.62$, $P<0.01$); 缺血 2h 组与缺血 4h 组强阳性率有显著性差异($\chi^2=4.80$, $P<0.05$); 表明随着缺血时间的推移, 表达逐渐增强。 LGI1 在正常组与缺血组阳性率有显著性差异($\chi^2=10.57$, $P<0.01$); 正常组强阳性率与缺血组强阳性率有显著性差异($\chi^2=28.42$, $P<0.01$); 缺血 1h 组与缺血 4h 组强阳性率有显著性差异($\chi^2=11.90$, $P<0.01$); 缺血 2h 组与缺血 4h 组强阳性率有显著性差异($\chi^2=3.91$, $P<0.05$); 表明随着缺血时间的推移, 表达也逐渐增强。在缺血脑组织中 PTEN 与 LGI1 有显著相关性($r=0.836$, $P<0.01$)。 **结论** 鼠脑缺血组织中存在 PTEN 及 LGI1 高表达, 两者有显著相关性, 并且随着缺血时间的推移, 表达逐渐增强。

关键词: PTEN; LGI1; 缺血脑组织; 免疫组化

中图分类号: R364.12 **文献标识码:** B **文章编号:** 1009-9727(2011)12-1512-02

The expression and its significance of PTEN-protein and LGI1-protein in ischemic rat cerebral tissues. XING Hong-shun, WANG Shou-xian, WANG Zhe, et al. (Weifang Municipal People's Hospital, Weifang 261021, Shandong, P. R. China)

Abstract Objective To investigate the expression of PTEN-protein and LGI1-protein in cerebral cortical of cerebral ischemia injury. **Methods** Immunohistochemistry (S-P Method) was used to detect the expression of PTEN-protein and LGI1-protein in cerebral tissues of different cerebral ischemia injury time. **Results** The expression of PTEN-protein and LGI1-protein in cerebral tissues in healthy team was significantly different, compared to the cerebral ischemia injury team. **Conclusion** The expression of PTEN-protein and LGI1-protein in cerebral tissues of cerebral ischemia injury is higher than that of healthy tissue and the longer the ischemia injury time the higher the expression of PTEN-protein and LGI1-protein.

Key words: PTEN; LGI1; Cerebral ischemia tissue; Immunohistochemistry

无论弥漫性脑缺血还是局部性脑缺血均可引起神经元凋亡, 凋亡是脑缺血损伤后脑细胞死亡的重要形式之一^[1]。人类第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(PTEN)是一种抑癌基因, 在体内可调节磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)/ 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(AKT)(PI3K/AKT)信号传导通路, 通过减少 PIP3, 抑制细胞增殖、导致细胞凋亡^[2]。LGI1(Leucine-rich gene-Glioma Inactivated) 基因是 Chernova 等在 1997 年分离出来的一种主要表达于神经组织, 尤其是脑组织的一种基因, 定位于染色体 10q24 区, 它所编码的蛋白质分子量为 60kD^[3], LGI1 基因的生物学作用可能与死亡受体介导的细胞凋亡途径有关联, 在胶质瘤及癫痫中有所研究, 在脑缺血中尚未见报道, 本研究探讨脑缺血缺氧组织中 PTEN 及 LGI1 的变化, 及其与缺血时间的关系, 为抗凋亡剂的研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用健康 SD 大鼠 60 只, 雌雄不限, 体重为 200g 左右, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供, 随机分为缺血 1h 组、缺血 2h 组、缺血 4h 组, 每组 20 只。

1.1.2 试剂 兔抗鼠 PTEN IgG 购自 Santa Cruz 公司, 兔抗鼠 LGI1 IgG 购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 参照 Zea Longa 的方法执行^[4], 造模成功评估标准: ①提尾时大鼠左前肢内收屈曲; ②爬行时向左侧倾倒或按逆时针方向转圈; ③右眼 Horner 征。

1.2.2 免疫组化检测 PTEN IgG 和 LGI1 IgG 的 SP 法检测按试剂盒说明书进行。

1.2.3 结果判断 PTEN 蛋白主要定位于胞浆, LGI1 蛋白定位于胞浆及胞核, PTEN 以细胞胞浆内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性, LGI1 以细胞胞浆及细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性, 高倍镜下在每一切片周边及中央取 8 个高倍视野, 计数 800 个脑组织细胞, 计算阳性细胞百分率, 以正常脑组织为对照。脑组织染色结果判定如下: 脑组织细胞无 PTEN 或 LGI1 表达或阳性脑组织细胞占脑组织细胞总数的比例 <50% 为阴性(-), 阳性脑组织细胞占脑组织细胞总数的 50%~75%、≥ 75% 分别为阳性(+)、强阳性(++)。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 13.0 统计学软件, 采用卡方检验

进行分析。

2 结果

正常脑组织及缺血组织均可见 PTEN 及 LGI1 染色,PTEN 染色主要位于胞质内,LGI1 位于胞浆及胞核。随着缺血时间的延长 PTEN 及 LGI1 的表达呈明显上升趋势,见表 1~2,PTEN 正常组与缺血组阳性率有明显差异性($\chi^2=8.26 P<0.01$),正常组与缺血各组强阳性率差异有统计学意义($\chi^2=20.90 P<0.01$),正常组与缺血 4h 组阳性率差异有统计学意义($\chi^2=4.16 P<0.05$);LGI1 正常组与缺血组阳性率差异有统计学意义 ($P<0.01$, $\chi^2=10.57$),正常组与缺血各组强阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=28.42 P<0.01$),PTEN 与 LGI1 在脑缺血中的表达呈正相关 ($r=0.836 P<0.01$),见表 3。

表 1 PTEN 在正常脑组织和缺血脑组织中的表达

组别	例数	阳性例数		阳性率%	强阳性率%
		+	++		
正常组	60	31	15	77.0	25.0
缺血 1h 组	20	8	10	90.0	50.0
缺血 2h 组	20	7	12	95.0	60.0
缺血 4h 组	20	2	18	100.0	90.0

表 2 LGI1 在正常脑组织和缺血脑组织中的表达

组别	例数	阴性例数	阳性例数		阳性率%	强阳性率%
			+	++		
正常组	60	16	32	12	73.3	20.0
缺血 1h 组	20	2	9	9	90.0	45.0
缺血 2h 组	20	1	6	13	95.0	65.0
缺血 4h 组	20	0	1	19	100.0	95.0

表 3 PTEN 和 LGI1 在缺血脑组织中表达的相关性

PTEN	LGI1	
	++	- +
++	35	6
- +	5	14

3 讨论

PTEN 是一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,定位于人染色体杂合性缺失高发区 10q23,从其 403 个氨基酸的读码框架 (ORF)找到一段酪氨酸磷酸酶功能域,另有一 175 个氨基酸序列与鸡张力蛋白同源。目前发现磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP3)是 PTEN 的主要作用底物,PTEN 可特异地切割 PIP3 这个第二信使的 D3 位磷酸基,将 PIP3 转变为 PIP2,PIP3 可通过蛋白激酶 B(PKB)抑制细胞凋亡,PTEN 可通过减少 PIP3 而促进细胞凋亡,PTEN 还可使局部粘连激酶 (focal adhesion kinase,FAK)去磷酸化而抑制细胞生长,PTEN 还可通过促细胞分裂素激活的蛋白激酶(MAPK)途径调控细胞转化和细胞周期^[5],通过以上途径使其具有调控细胞周期、促进细胞凋亡等多种生物学功能。目前在多种恶性肿瘤中已广泛研究,也有报道其介导的信号网络还广泛参与了缺血性脑损伤的病理生理过程^[6]。LGI1 即富含亮氨酸的胶质瘤失活基因,属于 LGI 基因家族,其编码的结构包括了一个 5'N 端的信号肽,中间是 3 个富含亮氨酸重复系列的功能区,它两端分别连接了富含半胱氨酸的重复系列,一个位于 N 端,另一个位于 C 端,3'C 端包括了七个前后排列的重复系列,这种结构提示 LGI1 编码的蛋白质包括了含有

LRR 重复系列的细胞外结构,跨膜结构和细胞内结构。这种结构布局所确定的一个新的基因家族还包含有其它三个成员 (LGI2,LGI3 和 LGI4),分别定位于 4p15.2,8p21.3 和 19q13.12^[7]。研究发现 LGI1 与胶质瘤的级别、预后明显相关,有文献报道,在胶质瘤中其可诱导细胞凋亡,但具体诱导凋亡机制尚不清楚,亦发现其与颞叶癫痫存在明显的关系,具体机制亦不清楚^[8],本研究采用免疫组化方法检测了 60 例缺血动物模型 PTEN 及 LGI1 蛋白的表达情况,结果发现脑缺血损伤中神经元细胞中存在 PTEN 及 LGI1 高表达 (阳性率及强阳性率均 $P<0.01$)。且与缺血损伤时间长短有关,缺血 1h 组与缺血 4h 组强阳性率有明显差异性 $P<0.01$,且 PTEN 与 LGI1 的表达呈正相关。表明 PTEN 及 LGI1 在脑缺血损伤中发挥一定的作用,关于缺血性脑损伤的机制主要有 3 种假说,即兴奋毒假说、钙相关假说和自由基假说,它们之间是相互联系的。大量研究表明,N-甲基-D-天门冬氨酸受体过度激活引起细胞内 Ca^{2+} 超载,进而介导兴奋性氨基酸毒性作用是缺血性脑损伤的主要机制^[9]。PTEN 可能是通过其磷酸酶活性增加 NMDA 受体活性,从而引起细胞凋亡,导致缺血损伤,但具体机制尚不清楚。LGI1 可能通过受体途径影响细胞程序性死亡加速神经元凋亡,从而引起缺血损伤,但具体机制亦不清楚。可以将 PTEN 及 LGI1 的免疫组化检测作为一个指标应用于脑缺血损伤的判断,可以通过进一步的研究探讨其在神经元损伤中的机制,为临床缺血性脑血管病的防治和新药的开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S et al. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain [J]. Neurobiol Dis JT-Neurobiology of Disease 2002, 11(2): 231-245.
- [2] Myers MP, Pass I, Batty IH et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13513-13518.
- [3] Chernova O, Cowell JK. Molecular definition of chromosome translocations involving 10q24 and 19q13 in human malignant glioma cells [J]. Cancer Genet Cytogenet, 1998, 105: 60-68.
- [4] Longa EL. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1998, 20(1): 84.
- [5] Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway[J]. J Clin Oncol, 2004, 22: 2954-2963.
- [6] 刘媛,蒋建新,曾琳.第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白在谷氨酸诱导海马神经元损伤中的作用研究[J].中国临床神经科学 2009, 17: 240.
- [7] Senechal KR, Thaller C, Noebels JL. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1 a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14: 1613.
- [8] Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T et al. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission [J]. Science, 2006, 313: 1792.
- [9] Kawaguchi M, Drummond JC, Cole DJ et al. Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia [J]. Anesth Analg, 2004, 98: 798.