

· 基础研究 ·

HLRP 蛋白在大鼠脑中的定位及 LPS 对其表达的影响 *

刘 扬¹ 史 明¹ 杜可军² 张 鹏³ 赵 钢^{1△}

(1 第四军医大学西京医院神经内科 陕西 西安 710032 ;

2 第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生教研室 陕西 西安 710032 ;

3 总装备部军械技术研究所 河北 石家庄 050000)

摘要 目的 :研究 HLRP 分子在大鼠脑中的细胞定位和表达特点 ,观察 LPS 刺激对动物脑 HLRP 表达的影响。方法 :对原代培养的大鼠神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和大鼠脑组织冰冻切片分别进行免疫荧光染色 ,观察 HLRP 的细胞定位和表达特点 ,给大鼠侧脑室注射 LPS ,提脑组织蛋白 ,进行 Western blot 检测 ,半定量分析 LPS 刺激后 ,大鼠脑 HLRP 的表达变化。结果 :①HLRP 选择性表达于部分神经元的细胞核中 ,正常的星形胶质细胞和小胶质细胞不表达 HLRP。②从嗅脑到脑干各节段 ,HLRP 在大鼠脑组织中均匀分布 ,未发现 HLRP 阳性神经元聚集的现象。③侧脑室注射 LPS 1 天以后 ,HLRP 表达明显升高($P<0.05$)。结论 :大鼠脑中正常表达 HLRP ,侧脑室注射 LPS 能刺激 HLRP 表达。

关键词 脂多糖 ;神经元 ;HLRP 基因 ;小胶质细胞 ;星形胶质细胞

中图分类号 :Q95-3 Q593.2 R322.81 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)10-1801-04

Distribution of HLRP in Rat Brain and Effects of LPS Lateral Ventricle Injection on HLRP Expression*

LIU Yang¹, SHI Ming¹, DU Ke-jun², ZHANG PENG³, ZHAO Gang^{1△}

(1 Department of Clinical Neurology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of Occupational and Environmental Health, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

3 The ordnance technology research institute, General Armaments Department, Hebei Shijiazhuang, 050000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the location of HLRP on different cells in rat brain, and the effect of LPS lateral ventricle injection on HLRP expression. **Methods:** Neurons, astrocytes, and microglia were cultured separately, and identified with anti-Tuj1, anti-GFAP, anti-OX42 IgG respectively. Then the three types of cells were co-labeled with anti-HLRP IgG to investigate the location of HLRP. Discontinuous frozen rat brain slices were gathered from olfactory brain to brainstem, then incubated with anti-HLRP IgG to observe the expression of HLRP. LPS solution was injected into rat lateral ventricle, and the expression of HLRP was analyzed with Westernblot method. **Results:** ① There was no HLRP expression in the neucleus of a certain subset of neurons, and astrocytes and microglia in normal conditions.② HLRP expression in rat brain showed no difference from olfactory brain to brainstem, and no HLRP positive neuron clusters were observed. ③ After the injection LPS solution to rat lateral ventricle, HLRP expression increased obviously 1d later ($P<0.05$). **Conclusion:** HLRP expressed at normal rat neurons, and HLRP expression increased after injection LPS solution to rat lateral ventricel.

Key words: LPS; Neuron; HLRP; Astrocyte; Microglia

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, Q593.2, R322.81 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)10-1801-04

前言

脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成成分。革兰氏阴性细菌感染机体后,LPS通过一系列信号转导通路使多种细胞因子的表达发生变化,引起广泛的炎症反应,介导多器官损伤、感染性休克等严重疾病^[1,2]。LPS所介导的信号通路一直是分子生物学研究热点,目前发现的若干关键

分子勾勒出 LPS 信号传递的大致途径,但相对于 LPS 广泛而复杂的生物学效应,该通路还有很多方面有待进一步的研究^[3,4]。人 Lrp(lipopolysaccharide responsed gene,HLRP)系我校军事预防医学系课题组采用基于 PCR 的改良消减杂交技术,从 LPS 刺激后的人牙髓细胞差异表达基因文库中筛选出的应答基因^[5,6]。本课题组用自主制备纯化的 HLRP 抗血清研究发现,HLRP 蛋白在多种体外培养的肿瘤细胞系中有不同程度的表

* 基金项目 国家自然科学基金项目(31170801)

作者简介 刘扬(1985-)男,硕士研究生,研究方向 脑损伤保护,E-mail: adrainyoung@126.com

△通讯作者 赵钢 教授,博士研究生导师,Tel 029-84775361

(收稿日期 2012-01-12 接受日期 2012-02-10)

达,并对 LPS 刺激有一定反应。由于该基因在大鼠中也有表达,并与人的该基因有很高同源性,因此本研究对 HLRP 蛋白在大鼠脑组织的细胞定位,以及 LPS 刺激后的表达变化进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 大鼠 40 只(200~250g),由第四军医大学实验动物中心提供。HLRP 抗血清由我校军事预防医学系惠赠,抗 Tuj1 抗体和抗 OX42 抗体购自 Abcam 公司,抗 GFAP 抗体购自 Santa Cruze 公司,生物素标记的二抗购自 Vector 公司,荧光标记的二抗购自 Invitrogen 公司。DMEM 培养基和 Neurobasal 培养基购自 Gibco 公司,新生小牛血清(FBS)购自杭州四季青公司,胰蛋白酶、LPS 和多聚赖氨酸购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司,Westernblot 化学发光试剂盒购自 Thermo 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 神经元的原代培养 无菌玻片放入 35mm 培养皿中,其上滴满 10%的 PDL 溶液,37℃包被 6h 后,将 PDL 吸除,用无菌去离子水清洗 3 遍,晾干后备用。孕 18 天 SD 大鼠麻醉后消毒腹部皮肤,剪开子宫取出胎鼠放入预冷的 D-Hanks 液。在超净台里取下胎鼠的大脑皮层,显微镜下剥除软脑膜和血管,剪碎组织,用 0.25%胰蛋白酶 37℃消化 10 min。用滴管将组织转移到含 10%FBS 的 DMEM 培养基中终止胰酶作用,重复一次后,用滴管吹散组织团块,将悬液用筛网过滤,弃去较大的组织块。滤液 1000 r/min 离心 5min,弃上清液,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基将沉淀重悬,细胞计数。每个放有玻片的 35mm 平皿中接种约 1×10^5 个细胞,2-3 天半量换液,10 天后,4%多聚甲醛(PFA)固定,用于免疫荧光染色^[7]。

1.2.2 星形胶质细胞和小胶质细胞的培养 玻片准备同上。取 P1 SD 大鼠,取下双侧皮质,消化吹散后,以 5×10^6 细胞/ml 密度接种于 75cm² 培养瓶中培养,第一周 DMEM+10%FBS 换液 2 次,第二周不更换培养液。培养第 12d 后摇床过夜分离出小胶质细胞,并将小胶质细胞和星形胶质细胞分别接种于 PDL 包被的玻片上,4%PFA 固定,用于免疫荧光染色^[8,9]。

1.2.3 免疫荧光双标记 细胞片用 4%PFA 中固定 20min 后,用 0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍。神经元玻片加入小鼠抗 Tuj1 抗体(1:1000),星形胶质细胞玻片加入山羊抗 GFAP 抗体(1:

500),小胶质细胞玻片加入小鼠抗 OX42 抗体(1:300),4℃孵育过夜。0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍后,分别加入生物素化的抗小鼠、抗山羊和抗小鼠 IgG,室温孵育 1h。0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍后,加入 Cy3 标记的链霉菌亲生物素蛋白,室温避光孵育 1h 后,0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍。再向细胞片加入抗 HLRP 抗体(1:300),4℃孵育过夜,0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍,加入 Cy2 标记的抗兔 IgG,室温孵育 1h,0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 遍后封片。

1.2.4 侧脑室定向注射 LPS 大鼠经 10%水合氯醛(3ml/kg)麻醉后,固定于脑立体定向仪。备皮后消毒皮肤,正中矢状切口,分离骨膜,牙科钻钻开颅骨,暴露硬脑膜。微量注射器单侧侧脑室缓缓注射新鲜配制的生理盐水(NS)或 LPS 溶液 10 μ l(10 μ g/ μ l,生理盐水配制),10min 注完,留针 10 min 后,缓慢退针。侧脑室的坐标定位依据大鼠脑立体定位图谱(包新民、舒斯云著)。前囟后 0.8mm,矢状缝旁开 1.5mm,脑表面下 4.5mm。术中注意无菌操作,避免术野污染。术后间断缝合皮肤,消毒后置于清洁环境,待注射 12h、1d、2d、4d 后分别处死动物,常规冰上取脑^[10]。

1.2.5 Western blot 鉴定 HLRP 的表达 将动物断头取脑,取适量皮质组织,显微镜下剥除软脑膜,加入 RIPA 裂解液+蛋白酶抑制剂后冰上研磨 20min,提取组织蛋白。BCA 法蛋白定量。之后行 80g/L SDS-PAGE 电泳,结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上。以抗 HLRP 兔血清为一抗,以小鼠抗兔 IgG-HRP 为二抗,用检测 HRP 的化学发光试剂盒显色。用 IPP 6.0 分析软件测量各组条带的光密度值。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,用 SPSS16.0 软件处理数据,组间均数比较用单通道方差分析(One-way ANOVA)。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 HLRP 在大鼠神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞的表达

免疫荧光双标记显示,HLRP 只在正常神经元中有表达,在正常星形胶质细胞和小胶质细胞中均无表达。即使在神经元中,HLRP 也只选择性地表达于部分细胞,HLRP 阳性神经元大多胞体较小、突起较少,而形态典型的锥体神经元一般为 HLRP 阴性。在神经元中,HLRP 主要集中于细胞核及周围,胞浆表达较少,突起中无 HLRP 表达。

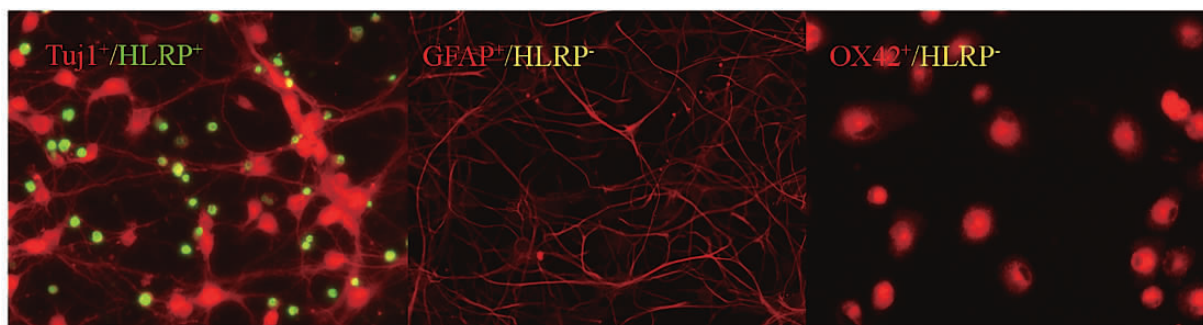


图 1 HLRP 在不同细胞类型的定位(200 $\times$)

Fig. 1 HLRP immunoreactivity in rat neuron, astrocyte, and microglia primary cultures (200 $\times$)

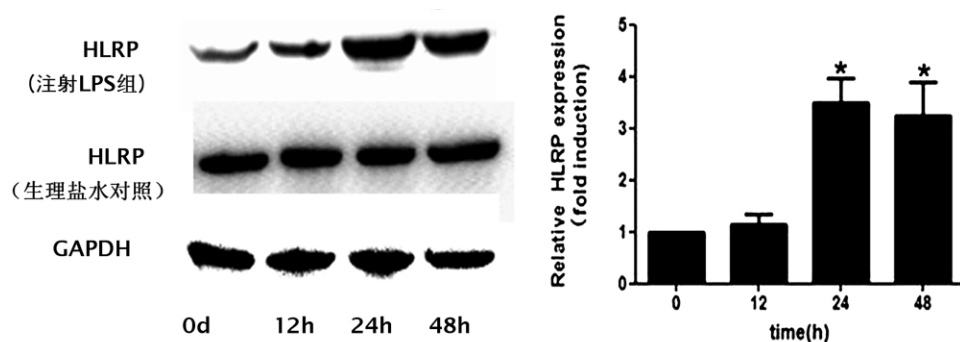


图2 大鼠侧脑室注射 LPS 1h 后, HLRP 表达明显增强

Fig.2 The expression of HLRP increased after rat lateral ventricle injection of LPS solution (200×)

2.2 HLRP 在大鼠脑组织中的表达特征

为了解 HLRP 在大鼠脑内的空间分布特点,我们对大鼠脑的连续切片进行了免疫荧光染色。结果显示 HLRP 在大鼠全脑中广泛均匀地分布,从嗅脑到脑干,HLRP 阳性神经元的分布一致,未见集中分布于某特定核团的现象。

2.3 侧脑室注射 LPS 后,大鼠脑中 HLRP 的表达变化

侧脑室注射 LPS 的大鼠,12h 时间点 HLRP 表达未见明显变化,1 天时,HLRP 表达明显升高,并至少持续到 2 天左右 ($P<0.05$)。而侧脑室注射生理盐水的对照组大鼠,脑内 HLRP 的表达并未见明显变化。

3 讨论

研究认为革兰氏阴性细菌感染机体后,LPS 首先与血清中的 LBP 和细胞表面的 CD14 结合,以三联复合物的形式激活 TLR4,再通过活化胞浆中的髓样分化因子 88 (myeloid-differentiation factor 88, MyD88)、TRIF 等分子进一步激活 MAPK 和 IKKs 信号通路,启动 AP-1、NF- κ B 等促炎症反应程序,并影响下游相关基因的表达^[11,12]。以上发现虽然勾画出 LPS 信号传递的若干关键步骤,但相对于 LPS 广泛而复杂的生物学效应,该通路还有很多方面有待进一步的研究。

筛选 LPS 刺激后表达发生改变的基因,并有目的地研究其功能,是增加对 LPS 信号通路认识的有效途径。HLRP 就是一种这样的 LPS 应答基因,HLRP 系我校军事预防医学系课题组采用基于 PCR 的改良消减杂交技术,从 LPS 刺激后的人牙髓细胞差异表达基因文库中筛选出的应答基因,其全长基因 GenBank 录入号为 NM 0183605。对其进行的生物信息学分析显示,该基因定位在 Xp22.2 序列中包含 2 个相互重叠的亮氨酸拉链[Leu-x(6)-Leu-x(6)-Leu-x(6)-Leu]为其特征结构,编码 528 个氨基酸。该课题组用自主制备纯化的 HLRP 抗血清研究发现,HLRP 蛋白在多种体外培养的人细胞系中均有不同程度的表达^[13-15],但对该蛋白在大体组织中的表达情况以及对 LPS 刺激后的表达谱没有相关报道。

HLRP 虽然是一种 LPS 应答基因,但根据免疫荧光双标的结果,HLRP 在大鼠脑内主要分布在神经元的细胞核周围,而不是分布在与炎症反应关系更密切的小胶质细胞和星形胶质细胞。据此可以认为 HLRP 在大鼠脑内并不直接参与触发炎症反应,也不直接调节炎症介质分泌,而更可能通过某种机制直接影响神经元的功能,来实现中枢神经系统对 LPS 刺激的应

答。另外,HLRP 在大鼠脑内的广泛分布提示它并不是通过直接影响特定神经核团发挥作用,因此可以认为 HLRP 更可能通过影响中间神经元的活动,并通过神经网络进行信号整合,来最终影响动物的神经功能。HLRP 并不表达于典型的锥体神经元,而是表达于一些胞体较小的、突起较少的神经元,这一现象既印证了我们的猜测,又提示我们进一步研究 HLRP 阳性神经元的类型和特点。

含亮氨酸拉链结构的蛋白不少都能以同二聚体或异二聚体的形式与特定的双链 DNA 结合,发挥增强子的作用,其自身的表达受 PKA、PKC 等蛋白激酶的调控,一些重要的信号转导分子如 CREB、C/EBP、Fos、Jun 等均属于这类蛋白^[16-20]。根据我校军事预防医学系课题组及我们的研究,HLRP 主要分布在细胞核周围,这提示 HLRP 处于 LPS 信号通路的较下游。考虑到 HLRP 分子内的亮氨酸拉链结构,我们推测它可能也发挥类似的作用,直接参与目的基因表达的调控。

本研究明确了 HLRP 在大鼠脑的表达情况,证实了 HLRP 参与大鼠脑对 LPS 的反应,为下一步继续研究 HLRP 的具体功能打下了基础。以后的实验中,我们一方面准备继续研究 HLRP 阳性神经元的类型和特征;另一方面初步验证 HLRP 能否直接与特定的 DNA 序列或其他信号分子结合,从而更深入地了解 HLRP 在中枢神经系统的功能。

参考文献(References)

- [1] Diks SH, Richel DJ, Peppelenbosch MP. LPS signal transduction: the picture is becoming more complex [J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4 (11):1115-1126
- [2] Knapp S, Florquin S, Golenbock DT, et al. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3189-3195
- [3] Nicolas C, Philipp M, Maxim NA, et al. Systematic Discovery of TLR Signaling Components Delineates Viral-Sensing Circuits [J]. *Cell*, 2011, 147 (11): 853-867
- [4] Lu YC, Yeh WC, Pamela SO, et al. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, (42): 145-151
- [5] 宋庆贺,柴玉波,陈苏民,等. 人 lrp-cDNA 全长编码区的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(5): 452-455
Song Qing-he, Chai Yu-bo, Chen Su-min, et al. Clone of full length molecule of human lipopolysaccharide responded gene and its expression in E.Coli[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2006, 27(5): 452-455
- [6] 于欣平,宋庆贺,侯立朝,等. 人 Lrp 蛋白多克隆抗体的制备[J]. 第四

- 军医大学学报, 2007,28(9):773-775
- Yu Xin-ping, Song Qing-he, Hou Li-chao, et al. Preparation of human Lrp polyclonal antibody [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2007,28 (9): 773-775
- [7] Mourlevat S, Galizzi JP, Guigal SN, et al. Molecular characterization of the AMPA-receptor potentiator S70340 in rat primary cortical culture: Whole-genome expression profiling [J]. Neurosci Res, 2011, 70(4):349-360
- [8] 司艺玲, 邓子辉, 杨涛, 等. 瘦素对体外培养的大鼠脑星形胶质细胞缺血缺氧耐受性的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2009,8(5):479-483
- Si Yi-ling, Deng Zi-hui, Yang Tao, et al. Leptin enhances the tolerance of rat brain astrocytes to ischemia and hypoxia in vitro[J]. Chin J Neuromed, 2009, 8(5):479-483
- [9] 贾济, 朱萧玲, 左志义, 等. CBR2 激活与小胶质细胞的活化和损伤的关系[J]. 现代生物医学进展, 2011,11(4):601-604
- Jia ji, Zhu Xiao-ling, Zuo Zhi-yi, et al. The relationship between CBR2 Activation and Injury Induced by Inflammation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(4): 601-604
- [10] 赵咏梅, 吕风月, 徐群渊. 脑源性神经营养因子在脑室注射脂多糖大鼠黑质多巴胺能神经元变性中的作用 [J]. 首都医科大学学报, 2009,30(5):648-652
- Zhao Yong-mei, Lv Feng-yue, Xu Qun-yuan. Effect of BDNF on Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra of a Model of Intra-ventricular Injection of Lipopolysaccharide in the Rat [J]. J Capital Med Univ, 2009,30(5):648-652
- [11] Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, et al. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. PLoS One, 2009, 4(5): 56-74
- [12] Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk[J]. J Dent Res, 2011, 90(4): 417-27
- [13] 毕媛, 骆文静, 侯立朝, 等. 全长 hlrp 分子在多种细胞系中的表达及其分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(5): 420-422
- Bi Yuan, Luo Wen-jing, Hou Li-chao, et al. Analysis of full length molecule of human lipopolysaccharide responded gene and its expression in four cell lines [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2007, 23 (5): 420-422
- [14] 宋庆贺, 于欣平, 陈苏民, 等. 人 Lrp 蛋白在细胞中的定位及 LPS 对其表达的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 542-546
- Song Qing-he, Yu Xin-ping, Chen Su-min, et al. Intracellular Location of Human Lrp and Effects of LPS on Lrp Expression in Human Cell Lines [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(7): 542-546
- [15] 宋庆贺, 陈苏民, 陈南春, 等. 全长人 lrp 基因及其截短和定点突变体真核表达载体的构建[J]. 科学技术与工程, 2006,14(6):2016-2018
- Song Qing-he, Chen Su-min, Chen Nan-chun, et al. Construction of eukaryotic expression vectors of lrp gene with its truncation and site-directed mutagenesis [J]. Science Technology and Engineering, 2006, 14(6): 2016-2018
- [16] Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. Trends Cell Biol, 2007, 17(7): 318-324
- [17] Asada R, Kanemoto S, Kondo S, et al. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology[J]. J Biochem, 2011,149(5):507-518
- [18] Peterson CW, Ayer DE. An extended Myc network contributes to glucose homeostasis in cancer and diabetes [J]. Front Biosci, 2011, 1 (17): 2206-2223
- [19] Junichi T, Yasuhiro Y, Yoshihiko K, et al. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation [J]. Cytokine, 2011, 54: 6-19
- [20] Pulak RM, Matthew TD, Douglas MS, et al. Role of basic leucine zipper proteins in transcriptional regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 302: 1-11

(上接第 1807 页)

- [12] Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine mediated siRNA delivery in vitro[J]. Pharm. Res, 2006, 23: 1868-1876
- [13] Peng Q, Zhong Z, Zhuo R. Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19: 499-506
- [14] Bieber T, Elsassner HP. Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection [J]. Biotechniques, 2001, 30: 74-81
- [15] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(18): 1313-1319
- [16] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery[J]. Gene Ther, 2006, 13(4): 283-287