

PrP^c 重组蛋白脑内接种金黄地鼠对 mRNA 表达的影响

杨建民¹ 赵德明¹ 李宁² 吴长德¹ 宁章勇¹ 郝永新¹ 韩彩霞¹

(1. 中国农业大学 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100094;

2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 为明确将牛 PrP^c 重组蛋白接种金黄地鼠脑内是否引起异常临床表现、脑组织病理学变化及其 mRNA 表达产生影响,为进一步研究 PrP^c 蛋白与异构体 PrP^{sc} 的结构转换机制提供基础数据,将纯化的牛 PrP^c 重组蛋白磷酸盐缓冲液制剂进行地鼠脑内接种,约 3 μL/只,对照接种磷酸盐缓冲液(PBS);102 d 后取出脑组织:一部分福尔马林固定后进行常规 H. E. 染色观察,另一部分提取脑组织总 RNA,进行实时荧光定量 RT-PCR 检测。结果表明:处理未见临床异常表现;大脑、小脑、脑干组织病理学检测未见海绵状空泡变性和淀粉样斑;大脑 PrP^c mRNA 表达水平无显著性差异。上述结果表明,用 PrP^c 重组蛋白接种,在检测时间 102 d 内未引起金黄地鼠行为和脑组织的异常改变。

关键词 传染性海绵状脑病; Prion 蛋白; 实时荧光定量 RT-PCR; mRNA 表达水平

中图分类号 Q 3-3; S 865.14

文章编号 1007-4333(2005)06-0027-06

文献标识码 A

Influence of recombinant bovine PrP^c protein on hamster mRNA expression by injection in brain

Yang Jianmin¹, Zhao Deming¹, Li Ning², Wu Changde¹, Ning Zhangyong¹, Hao Yongxin¹, Han Caixia¹

(1. National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratories Agrobiolgy Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract To observe biological specificity of recombinant bovine PrP^c protein, such as the pathology to hamster and influence on PrP^c gene expression level, a purified prion recombinant structure protein (10 μg/μL, 3 μL) was injected in the brain of six hamsters. Two hamsters injected with phosphatic salt buffer served as controls. The animals were sacrificed by bleeding through eyeball vein on day 102. Samples consisted of brain, cerebellum, and obex. A part of brain was fixed in formaldehyde, embedded in paraffin wax, sectioned, stained with H. E. and examined under microscope. Another part was used for total RNA extraction. PrP^c expression was tested using real-time RT-PCR in both test and control groups. The results indicated that, within 102 days, neither abnormal clinical symptoms nor histopathological changes and PrP^c gene expression difference were observed between the test and control group. This study has demonstrated that the recombinant protein failed to cause pathological change and PrP^c gene expression difference in tested rats. This finding provides a significant information on the prion structural biology based on the recombinant protein.

Key words TSE; Prion; real time PCR; mRNA expression

诺贝尔奖获得者 Prusiner 提出的“唯蛋白学说”认为朊病毒 (proteinaceous infectious particles, Prion, 又称传染性蛋白颗粒) 是传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy, TSE) 的感染因子。越来越多的研究证据进一步支持该假

说^[1-4],例如:朊病毒疾病的传播是由于机体正常细胞表面糖蛋白 (cellular prion protein, PrP^c) 转化为异常朊病毒蛋白 (disease-associated form prion protein, PrP^{sc}), 相应结构域由螺旋变为折叠结构, 构象变化引起疾病发生^[5]; 动物在感染和出现临床症状

收稿日期: 2005-03-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400325, 30571399)

作者简介: 杨建民, 讲师, 预防兽医学博士; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事 TSE 发生机理和诊断技术研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

期间,由最初少量的 PrP^{sc}引起宿主的 PrP^c发生转化,脑中产生大量的 PrP^{sc}而致病^[6-9]。

致病性朊病毒蛋白 PrP^{sc}具有抗蛋白酶有限水解的能力,它特异地出现在被感染动物的脑组织中,呈淀粉样存在^[10]。具有潜在神经毒性的 PrP^{sc}在中枢神经系统,尤其在脑内的积累可抑制 Cu²⁺与超氧化物歧化酶(SOD)或其他酶的结合,从而使神经细胞的抗氧化能力下降^[11-12];此外,细胞内的 PrP^{sc}可能还抑制微管蛋白的聚合,导致 L-型钙通道发生改变,进而使细胞骨架失去稳定性^[12]。上述这些原因以及其他尚不明了的原因最终都可使神经细胞发生凋亡并形成空泡,进而使各种信号传导发生紊乱^[13]。然而,PrP^c转换为 PrP^{sc}的机制尚不清楚。

有研究利用重组的人朊蛋白研究 PrP^c 构象转换,正常的 PrP^c 变为高度可溶性的、富含单体折叠结构的 PrP^{sc},并具有部分抗蛋白酶消化的活性^[14]。PrP^{sc}生物学鉴定主要依据脑内接种金黄地鼠后观察特征性的病理学变化^[15-17]。目前,人们对牛传染性海绵状脑病的发生和传播机理进行了大量的研究,尽管朊病毒研究虽已取得突破性进展,但对于朊病毒蛋白折叠和致病机理内在分子机制仍需深入探究,更需要充分的、直接的试验证据予以证实。要进一步深入研究重组 PrP^c 在特定条件下转化为 PrP^{sc}的机制,明确 PrP^c 的相关生物学特性是其中转化前后的生物学鉴定方法的确定是研究的关键环节^[18-19]。本研究首先对正常的 Prion 重组蛋白进行了脑内接种金黄地鼠脑组织病理学及对 mRNA 表达影响的研究,为进一步研究 PrP^c 重组蛋白转换 PrP^{sc}后的相关生物学特性提供了基础试验数据。

1 材料

1) PrP^c 重组蛋白为本课题组制备并保存。

2) 3 周龄雌性金黄地鼠 8 只购自北京生物制品研究所动物室,饲养于中国农业大学实验动物所清洁级实验动物房;大脑、小脑、脑干组织取自脑内接种 PrP^c 重组蛋白的 6 例金黄地鼠和脑内接种 PBS 的 2 例对照金黄地鼠,一部分组织液氮冻存,用于总 RNA 的提取,另一部分中性甲醛溶液固定,用于制备组织切片。

3) 主要试剂 TRIzol Reagent 逆转录试剂盒、DNase 均购自美国 Invitrogen 公司,PCR 试剂购自晶美生物公司,引物及 Mix 由北京东盛创新生物公司合成,其他各种化学试剂均为进口或国产分析

纯。

4) 主要仪器设备 MJ Research CFD-3220 Option™ 2Detector 荧光定量 PCR 仪;MICROM STP-120 旋转式组织处理机、MICROM HM 315 轮转切片机、MICROM HMS-760X 自动染色机均为德国 MICROM 公司产;蛋白垂直电泳仪及转移槽,美国 Bio-rad 公司。

2 方法

2.1 PrP^c 制备与纯化

本研究前期制备纯化的牛 PrP^c 重组蛋白。采用 PCR 扩增并克隆 2 例中国黑白花奶牛 PrP^c 基因,经 DNA 序列分析后,亚克隆至 PET30a(+) 表达质粒,优化条件进行目的蛋白表达。经 Western blotting 蛋白转印试验证实,所表达的蛋白具有良好的免疫反应性。

2.2 动物接种及脑组织保存

利用本研究前期制备纯化的牛 PrP^c 重组蛋白在磷酸盐缓冲液(PBS)中制成 1% 的悬液,进行地鼠颅内接种,接种量按体重的 15% 计算,约 3 μL/只(10 μg/μL);对照组地鼠颅内接种 PBS。临床观察并记录,102 d 后将地鼠经断颈处死,迅速取出脑组织。一部分置入 15% (体积分数) 的福尔马林固定液常规固定,进行 H. E. 染色观察;一部分液氮冻存,用于提取脑组织总 RNA,用于实时荧光定量 RT-PCR。

2.3 切片制备及 H. E. 染色

按常规方法进行组织固定、脱水、封蜡、修整蜡块、切片。脑组织切片的 H. E. 染色用常规方法。

2.4 总 RNA 的提取

取冻存组织 100 mg,加入 TRIzol Reagent 1 mL,匀浆后加入 0.2 mL 氯仿,离心后吸取上清,加入 0.5 mL 预冷异丙醇,离心沉淀后弃上清,80% (体积分数) DEPC 乙醇洗沉淀,DNase 酶解可能残余的基因组 DNA。RNA 溶于 DEPC 水,甲醛变性凝胶电泳和分光光度计检测浓度和纯度。

2.5 cDNA 制备

每个总 RNA 样品取 5 μg,加无 RNase 水至 4 μL,加入 20 μmol/L Oligo (dT 18) 1 μL,65 °C 加热 5 min,迅速置入冰中,依次加入 RNase 抑制剂 2 μL,5 × RT buffer 8 μL,10 mmol/L dNTP 取 2 μL,无 RNase 用水补足 40 μL,37 °C 反应 1 h,70 °C 加热 15 min 终止反应。

2.6 PCR引物设计

PrP^c 基因引物设计根据标准荧光定量 PCR 引物原则设计, PCR 引物序列:

PrPc F, 5 - GA CCGCTACTACTACCGTGAA - 3 ,

PrPc R, 5 - ACCATCA GGAA GA TGA GAAA - 3 ,

由上海生工生物工程技术有限公司合成。用 TE Buffer 配成 50 pmol/μL。

2.7 RT-PCR及测序反应

反应条件如下: 95 3 min, 94 变性 50 s、60 退火 50 s、72 延伸 50 s, 45 次循环, 72 延伸 5 min。1.5 g/100 mL 低熔点琼脂糖凝胶电泳分析结果。DNA 回收试剂盒回收目的条带, 测序确认序列正确后进行荧光定量 PCR 反应和分析。

2.8 荧光定量 PCR反应和分析

首先用对照组金黄地鼠脑组织样品检测反应, 获得反应条件。反应体系为 25 μL: 引物上游 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 模板 2 μL, DEPC 水 10 μL, MIX 12.5 μL。配制反应混合物模板量保持一致, 配制混合物充分混匀后平均分配至 PCR 管中。反应条件如下: 95 3 min, 94 变性 50 s、60 退火 50

s、72 延伸 50 s, 45 次循环, 72 延伸 5 min。设定在每个循环的变性期结束后, 程序自动记录上一循环最后 10 %时间的平均荧光值, 以表示在该循环结束时的 PCR 产物的量。反应完成后, 得到含所有标本的记录点曲线, 选择 PCR base linesubtracted (PCR 基线扣除) 模式进行数据分析和修正。在调整 Baseline cycles (基线循环) 和计算 Threshold value (域值) 后, 计算出 Threshold cycle (CT 值)。利用荧光值曲线和 CT 值就可以比较表达水平 (CT 值取中位数)。

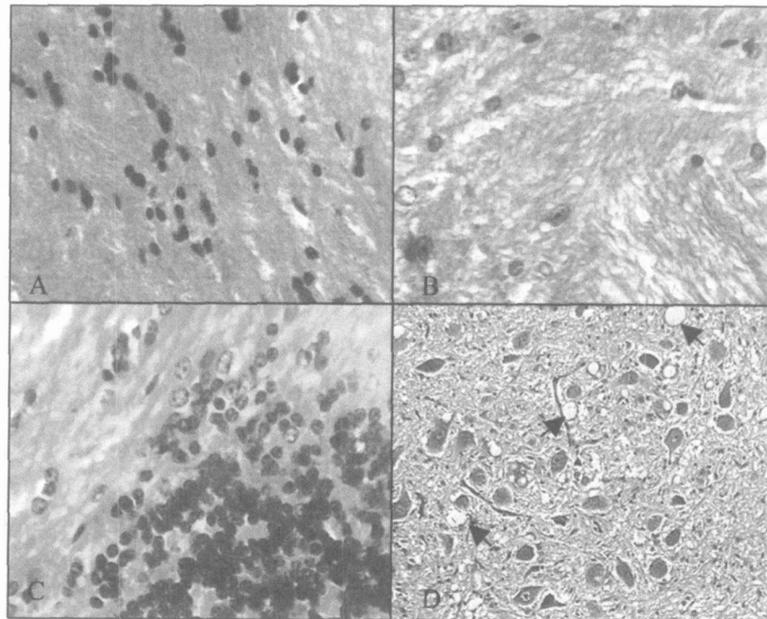
3 结 果

3.1 脑内接种后外观症状

处理组 6 只金黄地鼠经颅内接种重组 PrP^c 蛋白后, 102 d 观察期内未见异常临床表现。直至扑杀取材前对照组和实验组金黄地鼠仍全部健活。

3.2 脑组织病理组织学

处理组金黄地鼠和对照的神经病理学检测发现, H. E. 染色显示未见海绵状空泡变性和淀粉样斑及其他病理变化 (图 1), 说明脑内接种重组 PrP^c 蛋白, 在 102 d 观察期内, 未引起病理变化。



A 为大脑、B 为脑干 (Obex 部位)、C 为小脑, 脑组织切片, 未见特征性空泡变化, ×60
D 为牛 BSE 阳性脑组织切片 (由英国 VLA 提供), 显示特征性的空泡变化 (箭头所示), ×60

图 1 金黄地鼠脑内接种重组 PrP^c 蛋白后脑组织组织学观察 (H. E. 染色)

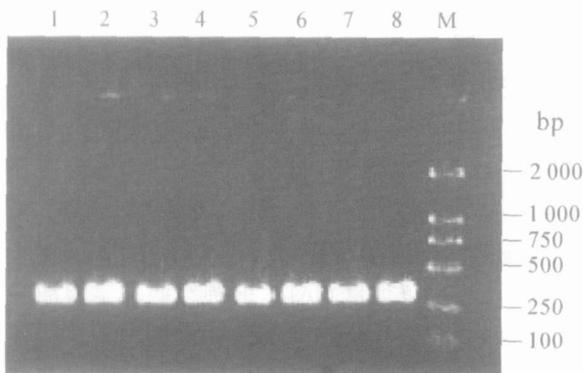
Fig. 1 Brain tissues from tested golden hamsters and BSE control

3.3 总 RNA 的提取

从实验处理和对照组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA,其中 28sRNA、18sRNA、5.8 sRNA 的目的条带清楚,其中 28 sRNA 条带比 18sRNA 条带明亮,说明提取的总 RNA 质量较高。

3.4 cDNA 制备及 RT-PCR 扩增

用从实验和对照组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA 经 RT-PCR,结果表明获得了预期大小的目的条带(图 2),经 DNA 回收试剂盒回收目的条带并测序后,确认序列正确。



M 为 DNA Marker DL2000;

1~6 为实验处理组 6 只地鼠样品;7、8 为对照组 2 只地鼠样品

图 2 处理和对照组金黄地鼠脑组织总 RNA RT-PCR 电泳检测结果

Fig. 2 RT-PCR of total RNA from golden hamsters

3.5 实时荧光定量 PCR 反应结果

用从对照组和处理组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA 经实时荧光定量 PCR,其中对照组做 2 次重复,结果表明所有检测样品均获得了标准的 S 形曲线,而且所有样品获得的曲线较为一致(图 3);所有检测样品获得的标准 S 形曲线 CT 值无显著差异。

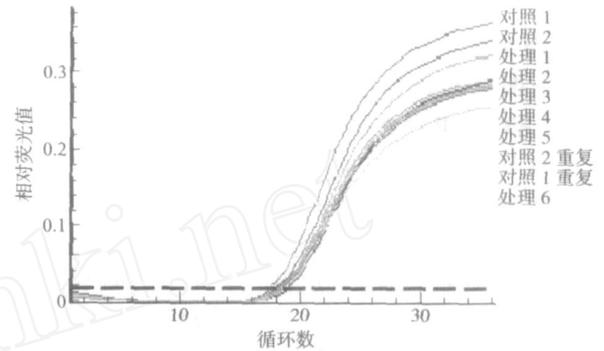


图 3 金黄地鼠脑组织总 RNA 实时荧光定量 PCR 反应 S 曲线

Fig. 3 Real-time PCR of total RNA from hamsters

用从对照组和处理组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA 经实时荧光定量 PCR 反应,其中对照组设立重复,结果表明所有检测样品获得的标准 S 形曲线 CT 值无显著差异(表 1),说明对照组金黄地鼠脑组织 PrPc mRNA 表达量无显著差异。

用从对照组和处理组金黄地鼠脑组织提取的总

表 1 金黄地鼠脑组织总 RNA 实时荧光定量 PCR 反应 CT 值

Table 1 Real-time PCR CT of total RNA from hamsters

样品	对照 1	对照 2	对照 1	对照 2	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6
CT 值	19.147	19.523	20.071	19.638	19.365	19.685	19.376	19.751	19.839	18.532

RNA 经实时荧光定量 PCR,其中对照组设立重复,结果表明所有检测样品获得的熔解曲线一致,且峰值单一,锐利(图 4)。说明对照组和处理组金黄地鼠脑组织总 RNA 实时荧光定量 PCR 反应特异性良好,而且目的 DNA 组份无显著差异。

用从对照组和处理组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA 经实时荧光定量 PCR,其中对照组设立重复,结果表明所有检测样品获得的熔解曲线一致,且峰值单一;所有样品获得的 T_m 值无显著差异(表 2)。

由表 2 还可以看出,用从对照组和处理组金黄地鼠脑组织提取的总 RNA 经实时荧光定量 PCR,其中对照组设立重复,结果表明所有样品获得的 T_m 值无显著差异,说明对照组和处理组金黄地鼠

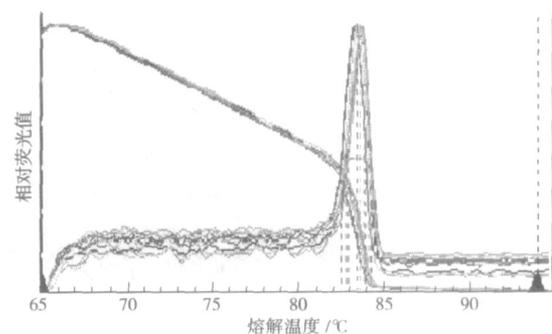


图 4 金黄地鼠脑组织总 RNA 实时荧光定量 PCR 反应熔解曲线

Fig. 4 Total RNA Real-time PCR melting curve from golden hamsters

表 2 金黄地鼠脑组织总 RNA 实时荧光定量 PCR 反应结果 T_m 值Table 2 Total RNA Real-time PCR T_m from hamsters

样品	对照 1	对照 2	对照 1	对照 2	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6
T _m 值	83.4	83.6	83.6	83.8	83.6	83.6	83.6	83.6	83.4	83.4

脑组织获得的目的 DNA 组份无显著差异,且重复性良好。

4 结论与讨论

有研究表明,用自然感染的羊瘙痒病(scrapie)脑组织提取物接种小鼠,可成功进行实验室感染^[20]。羊瘙痒因子可感染包括仓鼠在内的 20 余种动物,提示该因子具有较广的宿主感染性^[21~24]。其中,金黄地鼠是进行羊瘙痒因子感染实验良好的动物模型,为动物源性 TSE 的诊断和确定提供了实验基础。TSE 的共同神经病理改变是在脑组织中出現海绵状空泡变性和淀粉样斑块沉积^[19]。有研究利用重组的人朊蛋白研究 PrP^c 构象转换,正常的 PrP^c 变为高度可溶性的、富含单体 折叠结构的 PrP^{sc},且具有部分抗蛋白酶消化的活性^[25]。

致病性 Prion 蛋白(Prion protein, PrP)生物学鉴定主要依据脑内接种金黄地鼠后观察特征性的病理学变化^[26]。有研究显示,接种 Scrapie 提取物的金黄地鼠 86 d 后即可发病^[26]。本研究将重组 PrP^c 脑内接种金黄地鼠,观察 102 d 后,未出现特征性临床症状和病理组织学变化,初步说明重组 PrP^c 未能产生特征性病理变化。但是,重组 PrP^c 有别于 scrapie 天然提取物,观察重组 PrP^c 的致病性的时间延长有待进一步研究。

PrP^{sc} 感染鼠特定基因 EDRF 表达水平升高,该变化可作为诊断 TSE 的标识^[27~28]。

本研究结果表明所有检测样品获得的标准 S 形曲线 CT 值无显著差异,说明对照组金黄地鼠脑组织 Prion mRNA 表达量差异不显著,初步证实了重组 PrP^c 对金黄地鼠的非致病性特征。PrP^c 重组蛋白在检测时间内未能引起地鼠脑组织海绵状病理变化,未能引起 PrP^c mRNA 表达水平改变。

参 考 文 献

[1] Prusiner S B. Novel proteinaceous particles cause scrapie [J]. *Science*, 1982, 216: 136~144

[2] Satpute Krishnan P, Serio T R. Prion protein remodeling confers an immediate phenotypic switch [J]. *Nature*,

2005, 437: 262~265

- [3] Silveira J R, Raymond G J, Hughson A G, et al. The most infectious prion protein particles[J]. *Nature*, 2005, 437: 257~261
- [4] Johnson R T. Prion diseases[J]. *Lancet Neural*, 2005, 4: 635~642
- [5] Kovacs G G, Puopolo M, Ladogana A, et al. Genetic prion disease: the EUROCD experience [J]. *Hum Genet*, 2005, 27: 1~9
- [6] Roucou X, LeBlanc A C. Cellular prion protein neuroprotective function[J]. *Mol Med*, 2005, 83: 3~11
- [7] Zahn R, Liu A, Luhrs T, et al. NMR solution structure of the human prion protein [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 145~150
- [8] Knaus K J, Morillas M, Swietnicki W, et al. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization[J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 770~774
- [9] Mo H, Moore R C, Cohen F E, et al. Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 2352~2357
- [10] Brown D R, Hafiz F, Glasssmith L L, et al. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 1180~1186
- [11] Chattopadhyay M, Walter E D, Newell D J, et al. The octarepeat domain of the Prion protein Binds Cu() with three distinct coordination modes at pH 7.4[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12647~12656
- [12] Stanczak P, Valensin D, Juszczak P, et al. Structure and stability of the Cu() Complexes with tandem repeats of the chicken prion[J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 12940~12954
- [13] Bocharova O V, Breydo L, Salnikov V V, et al. Copper() inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils[J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 6776~6787
- [14] Heindl P, Fernandez G A, Buttner M, et al. some physico-chemical parameters that influence proteinase K resistance and the infectivity of PrP^{sc} after high pressure treatment[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38: 1223~1231
- [15] Baskakov I V, Bocharova O V. In vitro conversion of

- mammalian prion protein into amyloid fibrils displays unusual features [J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 2339-2348
- [16] Bocharova O V, Breydo L, Parfenov A S, et al. In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP (Sc) [J]. *J Mol Biol*, 2005, 346: 645-659
- [17] Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies [J]. *Nat Med*, 2001, 7 (3): 361-364
- [18] Shyu W C, Lin S Z, Chiang M F, et al. Overexpression of PrPC by adenovirus mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model [J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 8967-8977
- [19] García-Crespo D, Juste R A, Hurtado A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR. Analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie [J]. *BMC Vet Res*, 2005, 28: 3
- [20] Chandler R L. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrape brain material [J]. *Lancet*, 1961, 1: 1378-1379
- [21] Hadlow W J, Kenned Y R C, Race R E, et al. Virological and neurohistological findings in dairy goats affected with natural scrapie [J]. *Veterinary Pathology*, 1980, 17: 187-199
- [22] Hadlow W J, Kenned Y R C, Race R E. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1982, 146: 657-664
- [23] Somerville R A, Dunn A J. The association between PrP and infectivity in scrapie and BSE infected mouse brain [J]. *Archives of Virology*, 1996, 141: 275-289
- [24] Bruce M E, McBride P A, Jeffrey M, et al. PrP pathology and pathogenesis in scrapie-infected mice [J]. *Molecular Neurobiology*, 1994, 8: 105-112
- [25] Maximova O A, Taffs R E, Pomeroy K L, et al. Computerized morphometric analysis of pathologic Prion protein deposition in scrapie infected hamster brain [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 131: 273-286
- [26] Moleres F J, Velayos J L. Expression of PrP(C) in the rat brain and characterization of a subset of cortical neurons [J]. *Brain Res*, 2005, 1056: 10-21
- [27] Van Everbroeck B, Pals P, Martin J J, et al. Transmissible spongiform encephalopathies: the story of a pathogenic protein [J]. *Peptides*, 2002, 23: 1351-1359
- [28] Marella M, Lehmann S, Grassi J, et al. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 25457-25464