

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2086-04

腹腔注射脂多糖对大鼠海马 tau 蛋白磷酸化的影响*

刘英华, 尹君, 王建枝[△]

(华中科技大学同济医学院病理生理学系, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨脂多糖(LPS)对大鼠海马 tau 蛋白异常磷酸化的影响。方法: 腹腔注射不同剂量的 LPS 后不同时点取材, 采用 Western blotting 技术检测海马 tau 蛋白异常磷酸化情况。结果: 1. 腹腔注射 LPS 后均出现了 tau 蛋白表达总量增加; 2. 注射低剂量 LPS(200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW)后 8 h、16 h, tau 蛋白 Ser396/404 位点发生异常过度磷酸化, 而 64 h 则发生去磷酸化; Ser199/202 位点在各时点均发生去磷酸化; 3. 注射高剂量 LPS(2 mg/kg BW)时, tau 蛋白 Ser396/404、Ser199/202 及 Ser422 位点的磷酸化状态未发生改变, 而在 6 h 和 24 h, Ser214 位点出现了过度磷酸化。结论: 不同剂量的 LPS 腹腔注射可影响大鼠海马 tau 蛋白不同位点的磷酸化水平。

[关键词] 阿尔茨海默病; 脂多糖类; 炎症; tau 蛋白质类; 海马

[中图分类号] R745.7

[文献标识码] A

Effect of intraperitoneal injection of LPS on tau hyperphosphorylation in rat hippocampus

LIU Ying-hua, YIN Jun, WANG Jian-zhi

(Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of LPS on tau hyper-phosphorylation in rat hippocampus. **METHODS:** After intraperitoneal injection of different doses of LPS, the changes of tau phosphorylation in rat hippocampus at different time points were detected. **RESULTS:** 1. Intraperitoneal injection of LPS resulted in a significant increase in total level of tau. 2. tau was hyperphosphorylated at Ser396/404 at 8 h and 16 h, then dephosphorylated at 64 h after low dose injection of LPS (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW), while tau was dephosphorylated at Ser199/202 by the same treatment. 3. The phosphorylation status of tau at Ser396/404, Ser199/202 and Ser422 was not changed obviously with higher dose injection of LPS (2 mg/kg BW), and at this condition, hyperphosphorylation of tau at Ser214 was detected after 6 h and 24 h of the injection. **CONCLUSION:** Intraperitoneal injection of LPS influences tau phosphorylation in rat hippocampus at some sites seen in the brain of Alzheimer disease, implying that the involvement of inflammation is in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

[KEY WORDS] Alzheimer disease; Lipopolysaccharides; Inflammation; tau proteins; Hippocampus

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是常见的神经退行性疾病,神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)是其典型的病理特征之一。NFTs 主要由异常过度磷酸化的微管相关蛋白 tau 组成^[1,2],但 tau 蛋白异常过度磷酸化的机制至今尚不完全清楚^[6]。研究表明,AD 患者脑内存在胶质细胞的激活和大量炎症因子如 IL-1 的表达^[3,4],且已发现这些炎症因子在形成 NFTs 的神经元内存在,表明 AD 脑内存在炎症反应,而且和 tau 的异常磷酸化相关^[5-7]。

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性杆菌细胞壁的主要成分,可以作为非特异免疫刺激物质,引起炎症反应^[8]。LPS 也可以激活小胶质细胞释放某些炎症细

胞因子(如 IL-1),IL-1 又可以激活脑内的神经元和胶质细胞^[3,4,8]。因此 LPS 及其引起的炎症反应可作用于脑内的神经元与胶质细胞从而对神经元内 tau 蛋白的磷酸化产生一定的影响。已有研究报道 LPS 引起的炎症反应参与了 AD 样 tau 蛋白异常磷酸化的病理过程。在细胞水平,用 LPS 处理的原代小胶质细胞与神经元共培养,发现 tau 蛋白的异常过度磷酸化,并证明其作用机制是通过产生 IL-1,进而激活了 p38 MAPK 的活性^[6]。在动物,腹腔注射 LPS 后 3 h 可以引起大鼠海马内炎症因子 IL-1 的水平增加以及 p38MAPK 活性增强^[8]。还有人直接把含有 IL-1 的 Pallet 植入大鼠的大脑皮质,使其缓慢释放 IL-1,经过 21 d 也检测到磷酸化 tau 蛋白的过度

[收稿日期] 2005-02-28 [修回日期] 2005-06-10

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30430270; No. 30328007)

[△]通讯作者 Tel: 027-83693883; E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

表达以及 p38 MAPK 的激活^[5,7]。而且,炎性刺激也可以激活各种 MAPK,而 MAPK 又可以介导炎症因子 IL-1 进一步生成^[9]。但在动物整体水平还未有人报道 LPS 引起的急性炎症反应对 tau 蛋白磷酸化的影响。

本研究采用 Western blotting 方法,检测腹腔注射不同剂量的 LPS 后不同的时点大鼠海马 tau 蛋白磷酸化的改变,旨在探讨急性炎症反应对 tau 蛋白异常磷酸化的影响,为研究炎症反应在 AD 发病中的作用及机制提供依据。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

LPS (*Escherichia coli* O111:B4, 购自美国 Sigma 公司), 溶于生理盐水。单克隆抗体 PHF-1 (1:500, 由 Albert Einstein 医学院 P. Davis 博士馈赠), 用来检测 Ser396/404 位点的磷酸化 tau 蛋白; tau-1 (1:30 000, 由西北大学 Lester Bindle 博士馈赠) 检测 Ser199/202 位点的非磷酸化 tau 蛋白; 多克隆抗体 R134d (1:3 000) 和 R 145 d (1:500) (均由 New York 州立基础研究所 I Grundke Iqbal 教授馈赠) 分别用来检测 tau 蛋白总量和 Ser422 位点的磷酸化 tau 蛋白, 多克隆抗体 pS214 (1:1 000) (购自美国 Biosource 公司) 用来检测 Ser214 位点的磷酸化 tau 蛋白。免疫纯化的蛋白 G, 辣根过氧化氢酶标记羊抗鼠或羊抗兔的 II 抗 (1:5 000) 和化学发光底物 (enhanced chemiluminescent, ECL) 试剂盒购自 Pierce Chemical 公司 (Rockford, IL, USA)。

2 实验动物及处理

雄性 Wistar 大鼠, 体重 250-300 g (清洁级, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心), 在安静、室温 25 °C 左右 (由室内空调控制)、昼夜节律 12 h:12 h 的环境下饲养 1 周, 排除其非特异性刺激反应, 随机分成注射 LPS 剂量为 200 μg/kg BW (50 mg/L, 0.4 mL/100 g BW) 的 0 h (对照组)、8 h、16 h、32 h 及 64 h 组, 注射 LPS 剂量为 2 mg/kg BW (500 mg/L, 0.4 mL/100 g BW) 的 0 h (对照组)、2 h、6 h 及 24 h 组, 每组动物 3-6 只, 腹腔给药。

3 Western blotting

在不同时点将大鼠经腹腔注射 6% 水合氯醛 (0.6 mL/kg BW) 麻醉后断头处死, 迅速取出双侧海马, 一侧 -80 °C 冻存, 另一侧海马按照质量体积比 1:9 加入 500 μL 匀浆液 (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L Na₃VO₄·12H₂O, 5 mmol/L NaF, 1 mmol/L benzamidine, PMSF 临用前加入) 进行匀浆, 加入 1/3 体积的 4×上样缓冲液, 煮沸 10 min 使蛋白变性, 超声破碎, 12 500 ×g 4 °C 离心 15 min 取

上清。BCA 法 (PIERCE, 美国) 测定样品的蛋白含量, 各泳道的蛋白上样总量为 20 μg, 样品蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, 美国) 上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶 (TBS 稀释) 于室温振荡封闭 60 min, 加入用 3% BSA/TBS 稀释的 I 抗, 37 °C 孵育 2 h, TBS 缓冲液 (Tris 50 mmol/L, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5, 含 1% Tween 20) 冲洗 3 次, 加入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的 II 抗 (1:5 000, Amersham Pharmacia), TBS 缓冲液冲洗 5 次, 加入 ECL 显色液, 避光孵育 1 min, 弃去显色液, 暗室内 X 片曝光 2 min, 利用 Kodak Medical X-ray Processor (Japan) 成像。

4 炎症反应的监测

控制周围环境温度在 25 °C 左右的情况下, 用电子体温计测量各组大鼠直肠温度, 并注意观察大鼠的基本体征以及活动状况。

5 统计学处理

将免疫印迹结果扫描, 采用 ID Image Analysis software (Kodak, 美国) 对图像进行灰度测定, 所得数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 与对照组之间的比较用 *t* 检验。

结 果

1 体温及体征的改变

大鼠腹腔注射 LPS 后, 发现在 2-3 h 内都有不同程度的直肠温度升高, 基本从 (36.5 ± 0.5) °C 升高至 (38.5 ± 0.5) °C。并且实验者还观察到给药组大鼠在此期间出现双目无神、活动差的情况。该结果提示炎症反应模型复制成功。

2 LPS 对 tau 蛋白磷酸化的影响

2.1 低剂量组 腹腔注射 LPS (200 μg/kg BW) 后大鼠海马组织的 tau 蛋白经 Western blotting 检测结果显示: 总 tau 水平在 8 h、16 h、32 h 表达均高于对照组 (图 1A); tau 蛋白 Ser396/404 位点在 8 h 和 16 h 的磷酸化水平明显增加, 在 64 h 磷酸化水平则降低 (图 1B); 同时, tau 蛋白 Ser199/202 位点的非磷酸化水平在各时点均明显高于对照组 (图 1C)。

2.2 高剂量组 腹腔注射 LPS (2 mg/kg BW) 后大鼠海马组织的 tau 蛋白经 Western blotting 检测结果显示: 总 tau 水平在 24 h 明显高于对照组 (图 2a); PHF-1 和 R 145 d 显色虽有所增强, 但当用总 tau 蛋白作为参数进行计算后, 发现 PHF-1、tau-1 以及 R 145 d 检测 tau 蛋白在 Ser396/404、Ser199/202 以及 Ser422 位点的磷酸化水平与对照组无显著差异 (图 2c, 统计图未列出); tau 蛋白 Ser214 位点的磷酸化水平在 6 h 和 24 h 均明显高于对照组 (图 2b)。

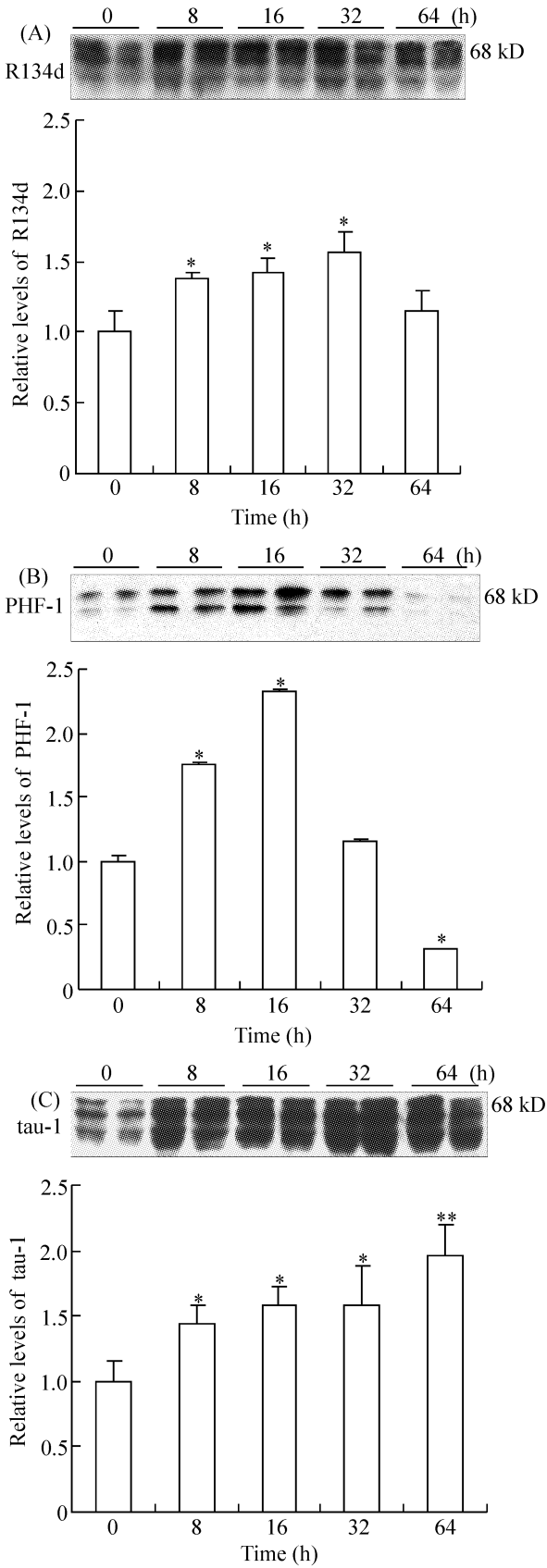


Fig 1 Alterations of tau phosphorylation after intraperitoneal injection of LPS (200 μg/kg BW). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

图1 腹腔注射 LPS (200 μg/kg BW) 后 tau 蛋白的磷酸化改变

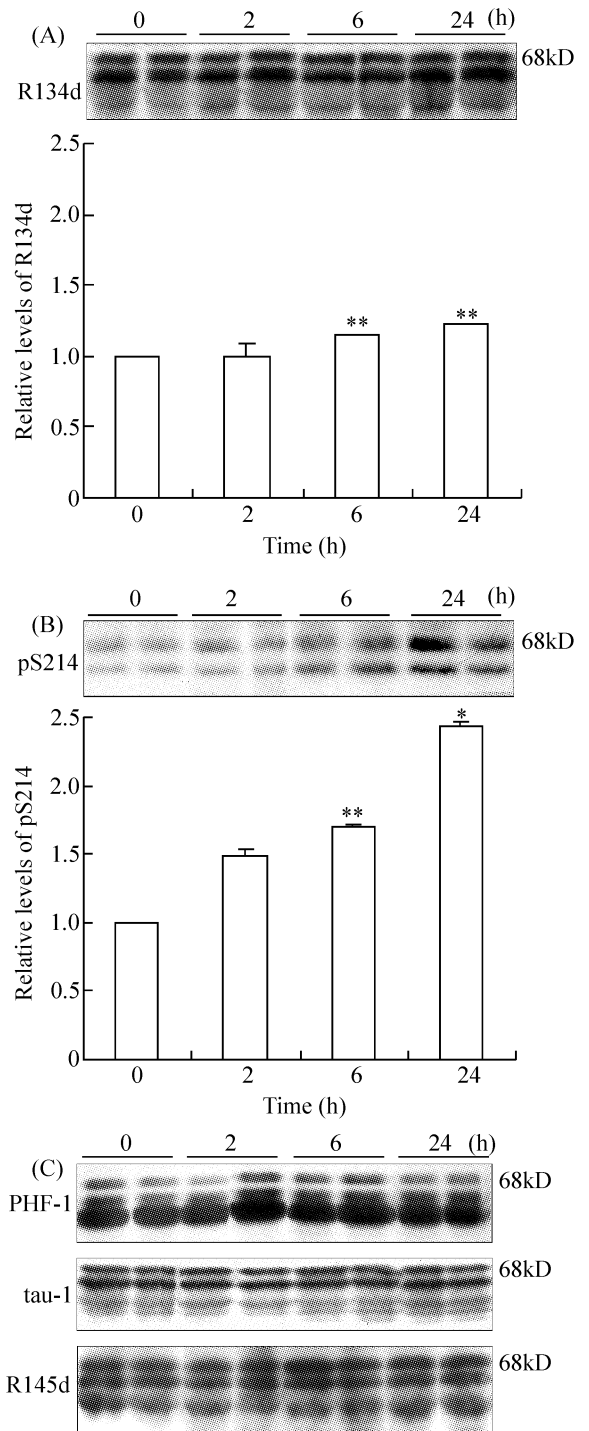


Fig 2 Alterations of tau phosphorylation after intraperitoneal injection of LPS (2 mg/kg BW). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

图2 腹腔注射 LPS (2 mg/kg BW) 后 tau 蛋白的磷酸化改变

讨 论

以往研究表明,IL-1 可促进 tau 蛋白的异常磷酸化^[5-7]。为进一步探讨急性炎症反应在 AD 样 tau 蛋白异常磷酸化中的作用,本研究采用大鼠腹腔注射不同剂量的 LPS,引起急性炎症反应(表现为给药

组大鼠体温升高,双目无神以及活动减少等),发现不同剂量 LPS 在不同时点引起 tau 蛋白的磷酸化水平出现如下特征性改变,即低剂量 LPS 组 8 h 和 16 h tau 蛋白 Ser396/404 位点以及高剂量 LPS 组 6 h 和 24 h tau 蛋白 Ser214 位点出现异常过度磷酸化。

已有研究证实,LPS 诱导的炎症因子可以进入缺乏血脑屏障的脑室周围,进而作用于脑实质^[10],而且 LPS 的受体如 CD14 和 TLR4 也在室周器官持续表达,LPS 可迅速引起这些受体的转录激活而进一步发挥后续的作用^[11]。LPS 可能通过调节蛋白激酶,如 p38MAPK,而引起 tau 蛋白的过度磷酸化^[5,6]。tau 蛋白的异常过度磷酸化可导致 NFTs 形成,造成微管的稳定性以及骨架蛋白的完整性下降而轴突丧失了正常的运输功能^[12]。tau 蛋白 Ser396/404 位点的过度磷酸化在 AD 发生、发展中的作用尤为重要,与 AD 患者的空间记忆和认知功能障碍密切相关^[13,14]。并且 Ser214 位点的磷酸化在 AD 神经元无缠结早期就存在,并贯穿缠结形成的整个过程^[15],因此,本研究发现 LPS 引起 tau 蛋白 Ser396/404 以及 Ser214 位点的异常过度磷酸化,为炎症反应参与 AD 的发病提供了新证据。至于在 LPS 低剂量组 64 h 又出现了 tau 蛋白在 Ser396/404 位点的去磷酸化,其机制尚待进一步研究加以阐明。

实验者还发现,在低剂量 LPS 注射后各个时点的 tau 蛋白 Ser199/202 位点出现了去磷酸化,而高剂量 LPS 注射后 tau 蛋白 Ser396/404、Ser199/202 以及 Ser422 位点的磷酸化情况均没有明显的改变,这与低剂量组相比有所不同。推测这些位点在相应的时点或不同剂量的 LPS 时可能是由于注射 LPS 后不仅激活了上述激酶或这些激酶对该位点失去作用,还可能同时激活了蛋白磷酸酯酶,如 PP-2A 等。此外,在低剂量组和高剂量组均出现了总 tau 水平的显著增加,表明 LPS 引起的炎性刺激导致了大鼠海马 tau 蛋白总量的增加,其机制尚待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, et al. The switch of tau protein to an Alzheimer like state includes the phosphorylation of two serine proline motifs upstream of the microtubule binding region [J]. EMBO J, 1992, 11(4): 1593 - 1597.
- [2] Hasegawa M, Morishima - kanashima M, Tokio K, et al. Protein sequeence and mass spectrometric analyses of Tau in Alzheimer disease brain [J]. J Biol Chem, 1992, 267(24): 17047 - 17054.
- [3] McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease [J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(6): 799 - 809.
- [4] Tuppoa EE, Ariasb HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 289 - 305.
- [5] Sheng JG, Jones RA, Zhou XQ, et al. Interleukin - 1 promotion of MAPK - p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation [J]. Neurochem Int, 2001, 39(5 - 6): 341 - 348.
- [6] Li YK, Liu L, Barger SW, et al. Interleukin - 1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38 - MAPK pathway [J]. J Neurosci, 2003, 23(5): 1605 - 1611.
- [7] Sheng JG, Zhu SG, Jones RA, et al. Interleukin - 1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins *in vivo* [J]. Exp Neurol, 2000, 163(2): 388 - 391.
- [8] Kelly A, Vereker E, Nolan Y, et al. Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin - 1 β on long term potentiation in rat dentate gyrus [J]. J Biol Chem, 2003, 278(21): 19453 - 19462.
- [9] Kim SH, Smith CJ, van Eldik LJ, et al. Importance of MAPK pathways for microglial pro - inflammatory cytokine IL - 1 β production [J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(4): 431 - 439.
- [10] Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition [J]. Trends Neurosci, 1995, 18(2): 83 - 88.
- [11] Laflamme N, Rivest S. Toll - like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram - negative bacterial cell wall components [J]. FASEB J, 2001, 15(1): 155 - 163.
- [12] Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, et al. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase - 2A and - 2B [J]. J Biol Chem, 1995, 270(9): 4854 - 4860.
- [13] Liu SJ, Zhang AH, Li HL, et al. Overactivation of glycogen synthase kinase - 3 by inhibition of phosphoinositol - 3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory [J]. J Neurochem, 2003, 87(6): 1333 - 1344.
- [14] Tian Q, Wang J. Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease [J]. Neurosignals, 2002, 11(5): 262 - 269.
- [15] Jicha GA, Weaver C, Lane E, et al. cAMP - dependent protein kinase phosphorylation on tau in Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 1999, 19(17): 7486 - 7494.
- [16] 张 蕻,胡茂琼,代小燕,等. 去势雌性大鼠海马区 Tau 蛋白 Alzheimer 样磷酸化的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(12): 2291 - 2293.