

朊蛋白在宁夏滩羊不同组织中表达的免疫组化研究

许立华^{1,2}, 康晓东³, 涂 健¹, 张珠明^{1,2}, 杨建民¹,

周向梅¹, 尹晓敏¹, 杨利峰¹, 赵德明^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100193;

2. 宁夏大学农学院, 银川 750021;

3. 宁夏农林科学院 畜产工程技术中心, 银川 750004)

摘要: 作者运用免疫组织化学技术, 首次对我国一类保护物种宁夏滩羊各组织中朊蛋白(PrP)的分布进行定性、定位研究。结果显示, PrP在滩羊的大脑、脑干、小脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏及淋巴结均有表达, 尤其在脾脏、肾脏、脑干、淋巴结中的表达量丰富, 而肺脏检测结果为阴性。此研究确定了朊蛋白在滩羊各组织中的表达与分布状况, 并优化了朊蛋白检测的技术条件, 为羊痒病的诊断与检测提供技术支持。

关键词: 朊蛋白; 组织; 表达; 免疫组化; 滩羊

中图分类号: S852.659.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0301-04

Immunohistochemical Study on PrP Expression in Different Tissues of Tan Sheep in Ningxia

XU Li-hua^{1,2}, KANG Xiao-dong³, TU Jian¹, ZHANG Zhu-ming^{1,2}, YANG Jian-min¹,

ZHOU Xiang-mei¹, YIN Xiao-min¹, YANG Li-feng¹, ZHAO De-ming^{1*}

(1. National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. Technology Center of Animal Products, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750004, China)

Abstract: In the present experiment, a qualitative detection was implemented to determine distribution and location of prion protein(PrP) in different tissues of Ningxia Tan sheep, which is one of the protected species of class I. The result indicated that PrP has a wide range of expression in different tissues, such as cerebrum, brain stem, cerebellum, heart, liver, spleen, kidney, lymph node and so on. Especially, prion protein has a higher expression level in brain stem, spleen, kidney and lymph node than other tissues. We also got a negative result in the samples from lung. This study confirmed the status of distribution of PrP in different tissues from Tan sheep. In addition, the study provided a technical support to diagnose and detect scrapie by optimizing immunohistochemical method.

Key words: prion protein; tissue; expression; immunohistochemistry; Tan sheep

朊病毒病是人和动物的一系列神经退化性疾病, 该病的发生是由于组织细胞的正常朊蛋白(PrP^C)的错误折叠, 引起三维构象的变化, 进而导

致致病性朊蛋白(PrP^{Sc}) 在组织中蓄积而引起的^[1]。组织细胞的正常朊蛋白(PrP^C) 在哺乳动物的多数脏器组织中都有表达, PrP^{Sc}的致病性与 PrP^C 在不同组织中的表达量关系密切。PrP^C 在胚胎发育的

收稿日期: 2009-09-19

基金项目: 科技部星火计划(2006EA125015); 国家科技支撑计划(2008BAI54B06)

作者简介: 许立华(1972-), 男, 宁夏银川人, 副教授, 博士生, 主要从事动物疫病分子病原学与疫病诊断及防治技术研究, Tel: 010-62732980, E-mail: littlezhe99@163.com

* 通讯作者: 赵德明, Tel(Fax): 010-62732975, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

早期就有表达,在成年动物机体大多数组织细胞,如神经细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞、血小板、胃肠道黏膜上皮细胞等都有发现,尤其在中枢神经系统高度表达^[2-3]。异常的朊蛋白(PrP^{Sc})可广泛分布于细胞的高尔基体内、包涵体和溶酶体中,PrP^{Sc}的积聚导致空泡形成,从而形成了朊病毒病的物质基础。

滩羊是我国特有的、珍贵的绵羊品种,主要分布在宁夏及其毗邻的甘肃、陕西、内蒙古等地,尤其以宁夏境内数量最多,品质纯正。宁夏滩羊与浙江湖羊、山东鲁西小尾寒羊同属国家一类保护物种,在国内养羊业中占有一定的地位。迄今为止,宁夏滩羊是我国唯一可生产二毛裘皮(即轻裘毛皮)的羊种,被公认为我国特有的名贵裘皮用绵羊品种。近几年,宁夏回族自治区陆续向中东地区一些国家出口冷鲜滩羊肉,使宁夏滩羊的国际影响力逐年扩大,这也对兽医行政管理部门和检验检疫部门按照国际惯例对活羊及肉品进行疫病检疫提出了更高的技术与方法要求。

关于滩羊朊蛋白(prion protein, PrP)的相关研究未见报道。本研究运用免疫组织化学技术,首次对宁夏滩羊各主要脏器组织中的正常朊蛋白(PrP^C)的分布进行了定性、定位研究,为阐明朊蛋白在组织中的表达量与朊病毒(prion)的感染部位之间的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验用动物及取材

15只健康成年宁夏滩羊,宰杀后采取新鲜脏器组织,包括大脑、小脑、脑干、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及淋巴结等,用10%福尔马林溶液固定备用。

1.2 主要仪器设备

切片机、染色机、脱水机均为德国MICROM公司产品;生物组织包埋机为BMJ-1天际航空机电公司产品;OLYMPAS U-SRG显微镜(日本)。

1.3 试验所用试剂(盒)

PrP单克隆抗体AH6购自英国TSE Resource Center;二步法免疫组化检测试剂盒(PV-9000)、浓缩性DAB、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(PV-6002)、中性树胶(Fisher Scientific)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其他常用试剂均为国产分析纯。

1.4 样品的制备

采集的脏器、组织经10%福尔马林固定后常规制备石蜡切片。

1.5 免疫组织化学检测^[4-5]

1.5.1 石蜡切片脱蜡至水,用0.01 mol·L⁻¹ PBS洗涤2 min×3次。

1.5.2 3% H₂O₂ 去离子水 37℃湿盒中孵育10~15 min, PBS洗2 min×3次。

1.5.3 高压煮沸10 min修复抗原, PBS洗2 min×3次。

1.5.4 滴加不同稀释度的PrP单克隆抗体AH6(1:200、1:500、1:1000),每个稀释倍数重复3张组织片,37℃湿盒中孵育120 min, PBS洗2 min×3次。用PBS代替PrP单克隆抗体作为阴性对照。

1.5.5 滴加山羊抗小鼠IgG抗体-HRP复合物,37℃湿盒中孵育60 min, PBS洗2 min×3次。

1.5.6 DAB显色;按照说明书配制并滴加DAB显色剂,滴加剂量以完全覆盖组织为度,室温避光显色5~15 min。

1.5.7 苏木精复染,以不超过1 min为宜。滴加中性树胶封片。于显微镜下观察结果并采集图像。

2 结果

2.1 单抗工作浓度的确定

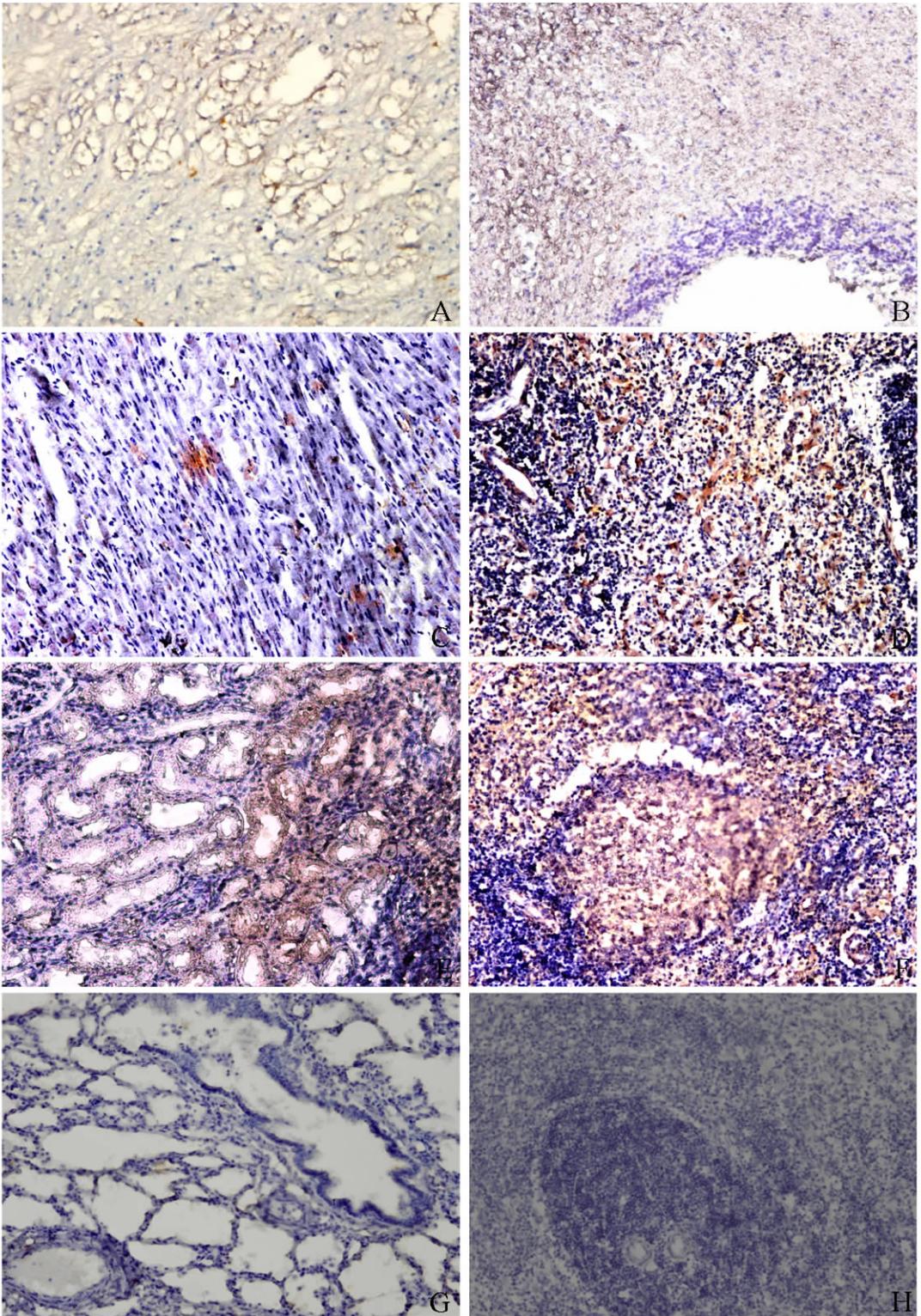
PrP单克隆抗体AH6以1:200稀释的作用效果最好,着色清晰,阳性染色(棕黄色)明显,结果易于识别。

2.2 滩羊各组织PrP的检测结果

免疫组织化学检测结果显示,在滩羊的大脑、脑干、小脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏及淋巴结中均观察到了PrP的表达,尤其在脾脏、肾脏、脑干、淋巴结中,PrP的表达量丰富。脑干部神经元排列密集,在脑干的间脑部(图1A)有朊蛋白表达,可见明显的棕黄色或棕红色颗粒或片状区域。小脑灰质的分子层、颗粒层结构明显,分子层朊蛋白的表达区域较为广泛,显示出浓密的棕红色区域(图1B)。心脏的心肌纤维排列致密,结构完整,朊蛋白在其中散在分布,呈现点状或片状棕红色反应区(图1C)。朊蛋白在脾脏的分布广泛,表达量多,在红髓、白髓均可以观察到(图1D)。肾脏中朊蛋白的表达与分布主要集中在肾小管,在近曲小管、远曲小管的上皮细胞大量表达(图1E)。淋巴结中的朊蛋白数量众多,分布广泛,且多集中在淋巴小结、髓索、髓窦(图1F)。肺脏的肺泡结构完整,肺泡上皮细胞未检出朊蛋白的表达,结果为阴性(图1G)。以不加单抗的脾脏作为对照,未见有棕黄色颗粒出现,见图1H。

3 讨论

朊蛋白(PrP)在哺乳动物中高度保守,可能存在于所有脊椎动物。正常朊蛋白(PrP^C)的生理功能在阐明朊病中枢神经系统致病机理中有着重要作用。哺乳动物PrP^C N端的八肽重复序列区是较为保守的序列,对几种动物朊蛋白的八肽重复区的研究结果证实了该段序列能特异地与二价铜离子结合,



A. 脑干; B. 小脑; C. 心脏; D. 脾脏; E. 肾脏; F. 淋巴结; G. 肺脏(阴性); H. 脾脏的阴性对照染色

A. Brain stem; B. Cerebellum; C. Heart; D. Spleen; E. Kidney; F. Lymph node; G. Lung(Negative); H. Negative control staining of spleen by omitting primary antibody

图 1 宁夏滩羊不同组织中 PrP 表达的免疫组织化学检测结果 200×

Fig. 1 Immunohistochemistry detection of PrP in different tissues of Tan sheep 200×

而对其他金属离子没有此功能^[6]。有研究认为 PrP^C 与铜离子的结合会影响其结构和生化特性,如脑组织抽提物中的重组 PrP 与铜离子的共孵育会启动正常朊蛋白由 α -螺旋向 β -折叠空间构象的转变,伴随折叠物的形成,该折叠物不能被蛋白酶 K 消化且不能被变性剂灭活,具有 PrP^{Sc} 的所有特性^[7]。这一研究说明正常生理条件下一定浓度的铜离子或过量铜离子的存在,具有促进 PrP 空间构象转变,进而引起朊病发生的作用。PrP^C 另一个重要的生理功能是可作为细胞外环境中铜离子递呈的循环受体,保护细胞免受游离铜离子的毒性攻击^[7]。研究表明,PrP^C 也可在免疫系统中广泛表达,它可能参与淋巴细胞活化,或可能与电压敏感性钙通道相作用而调节细胞内游离钙浓度,进而在海马突触传递等神经元间或神经元与神经胶质细胞间的信息传递中发挥作用^[3]。

朊病毒的主要易感宿主为牛、羊、鹿、猫、水貂和人,但未见有关猪和鸡感染朊病毒的报道。然而,目前仍然不清楚哺乳动物间朊病毒传播屏障的准确分子机制。朊蛋白基因(*PRNP*)和朊病毒毒株对朊病毒的跨种间传播具有重要影响^[8-10]。研究人员用免疫组化的方法证实了感染克-雅氏病病毒小鼠的脾脏、肝脏、胸腺、淋巴结和肠道集合淋巴结中,朊病毒染色呈阳性的细胞是胸腺的树突状细胞、皮质上皮细胞、滤泡树突状细胞及肝脏郎罕氏细胞^[11]。Aguzzi 等研究表明,在病原入侵中枢神经系统前,在脾脏、淋巴结等外周淋巴器官、组织中已检测到很高浓度的 PrP^{Sc},随后通过不同途径侵入中枢神经系统引起中枢神经组织损伤,证实了外周淋巴组织是 PrP^{Sc} 复制或增殖的第一场所^[12]。因此,研究 PrP^C 在组织器官中的分布以及在不同组织中的含量,对了解传染性海绵状脑病(TSE)的发病机理、传播途径以及不同动物对 TSE 的易感性都具有重要意义。

朊蛋白(PrP)基因的表达和随后的翻译在朊病毒病的发生上起重要作用,PrP 基因表达量高的组织有较高的转化成 PrP^{Sc} 并且蓄积的危险。本试验表明,正常朊蛋白(PrP^C)在滩羊的大脑、脑干、小脑、肝脏、脾脏、肾脏、心脏及淋巴结均有表达,且在有些组织中呈现高表达量。虽然在滩羊肺组织没有检测到 PrP^C,但这并不能说明该组织中不含有 PrP^C,可能由于表达量低而难以检出,或由于 PrP^C 空间结构的存在,某些抗原位点可能处于被隐蔽状态,而抗原修复方式对一些构象依赖性的位点会造成影响,从而导致抗原位点的暴露存在差别,这些因素都将影响免疫组化检测的结果。

作为国内首次研究朊蛋白(PrP)在宁夏滩羊各脏器的表达与分布,本研究通过对免疫组织化学检测方法的优化,为检验检疫机构和动物疫病预

防与控制部门提供羊痒病的检测技术与方法,也对宁夏滩羊这一珍贵绵羊品种的遗传性状与遗传信息提供有力补充。

4 结 论

应用免疫组织化学法检测了朊蛋白在宁夏滩羊主要组织器官的表达与分布状况,确定了朊蛋白在脾脏、肾脏、脑干、淋巴结中的表达量高于其他组织。优化了朊蛋白检测的技术条件,可为羊痒病的诊断与检测提供技术支持。

参考文献:

- [1] PRUSINER S B. Prion diseases and the BSE crisis [J]. *Science*, 1997, 278: 245-251.
- [2] HARRIS D A. Cellular biology of prion diseases [J]. *Clin Immunol Rev*, 1999, 12: 429-444.
- [3] LI R, LIU D, ZANUSSO G, et al. The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes [J]. *Cell Immunol*, 2001, 207(1): 49-58.
- [4] 张太翔, 赵德明. 朊蛋白基因在奶牛生殖系统不同组织中的表达量测定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(4): 263-267.
- [5] 乔俊文, 苏晓欧, 赵德明, 等. 免疫印迹法检测绵羊朊蛋白 PrP^C 的研究 [J]. *中国兽医杂志*, 2008, (1): 23-24.
- [6] HOMSHAW M P, MCDERMOTT J R, CANDY J M. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian PrP protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 207(2): 621-629.
- [7] PAULY P C, HARRIS D A. Copper stimulates endocytosis of the PrP protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(50): 33107-33110.
- [8] BUELER H, AGUZZI A, SAILER A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie [J]. *Cell*, 1993, 73(7): 1339-1347.
- [9] MORENO C, LANTIER F, LANTIER I, et al. Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice [J]. *Genetics*, 2003, 165(4): 2085-2091.
- [10] STEPHENSON D, CHIOTTI K, EBELING C, et al. Quantitative trait loci affecting PrP incubation time in mice [J]. *Genomics*, 2000, 69(1): 47-53.
- [11] MCBRIDE P A, EIKELNBOOM P, KRRAL G, et al. Prp protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie infected mice [J]. *J Pathol*, 1992, 168(4): 413-418.
- [12] AGUZZI A, HEPNER F L, HEIKENWALDER M, et al. Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS [J]. *Br Med Bull*, 2003, 66: 141-159.