

# 绵羊组织中朊病毒受体 37kDa/67kDa LRP/LR mRNA 转录水平研究

乔俊文, 苏晓鸥, 王伊琴, 周向梅, 杨建民, 尹晓敏, 马李颖, 赵德明\*

(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)

**摘要:** 本研究旨在检测绵羊组织中朊病毒受体 37kDa/67kDa LRP/LR mRNA 水平并探讨其与朊病毒组织嗜性的关系。选用背景相似的 6 只内蒙绵羊, 提取组织 RNA, 反转录 RT-PCR 构建 cDNA 模板; 利用本研究前期构建的标准质粒及标准曲线, 对组织中该受体 mRNA 水平进行 Real-time(实时)荧光定量 PCR 检测。结果表明, 大脑皮质中的受体表达水平最高( $P < 0.05$ ), 其次为心脏和脑干, 中等表达的器官依次为海马、小脑、脾脏、丘脑、肠系膜淋巴结、肝脏和肾脏, 表达量最低为肺脏( $P < 0.05$ )。结果提示, 朊病毒受体——37kDa/67kDa LRP/LR 在绵羊各组织中的表达量高低与朊病毒的复制程度有一定的相关性, 受体 LRP/LR 表达量较高的区域朊病毒复制水平相对较高。结果提示朊病毒入侵机体后, 组织器官 PrP<sup>Sc</sup> 聚集程度可能与受体 37kDa/67kDa LRP/LR 表达水平相关。

**关键词:** 37kDa/67kDa LRP/LR; Real-Time PCR; mRNA; 绵羊; PrP<sup>Sc</sup>; 复制

中图分类号: S852.659.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-1043-05

## The Quantitative Research on the mRNA Transcription Level of the Prion Receptor—37kDa/67kDa LRP/LR in Ovine Tissues

QIAO Jun-wen, SU Xiao-ou, WANG Yi-qin, ZHOU Xiang-mei,  
YANG Jian-min, YIN Xiao-min, MA Li-ying, ZHAO De-ming\*

(National TSE Lab, College of Veterinary Medicine,  
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The aim of the present study was to detect the mRNA transcription level of prion receptor—37kDa/67kDa LRP/LR in ovine tissues. The real-time RT-PCR was employed for the quantitation of mRNA transcription level of 11 tissues from six sheep with the same background. The synthesis of cDNA for each sample was firstly performed by RT-PCR after the isolation of RNA from various tissues in sheep. The results showed that the highest LRP/LR mRNA transcription level was found in neocortex ( $P < 0.05$ ), which exhibiting as much as ten-fold higher than in lung, followed by heart and obex ( $P < 0.05$ ); intermedia transcription was occurred in hippocampus, cerebellum, spleen, thalamus, mesenteric lymph node; the lower transcription was occurred in liver and kidney, and the lung expressed extremely lowest but detectable level of LRP/LR mRNA ( $P < 0.05$ ). These results indicated that altered expression profiles of laminin receptor in various ovine normal tissues are basically corresponding to the degree of PrP<sup>Sc</sup> accumulation, and tissues expressing high levels of LRP/LR may have higher potential susceptibility to PrP<sup>Sc</sup>. Our results also suggest that in ovine tissues, the degree of PrP<sup>Sc</sup> propagation was correlated with the expression level of prion receptor, 37kDa/67kDa LRP/LR.

**Key words:** 37kDa/67kDa LRP/LR; real-Time PCR; mRNA; sheep; PrP<sup>Sc</sup>; replication/propagation

收稿日期: 2008-11-07

基金项目: 国家自然科学基金(30771622); 科技部星火计划(2006EA125015)

作者简介: 乔俊文(1982-), 男, 内蒙和林县人, 博士生, 主要从事动物病理学及朊病毒病研究, E-mail: qiaojw@cau.edu.cn

\* 通讯作者: 赵德明, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

朊蛋白受体这一观点最初由 David Harris 在 1997 年提出,该研究发现在酵母双杂交系统中,朊蛋白可与 37kDa/67kDa LRP/LR(层黏蛋白受体)直接发生相互作用,同时在感染痒病(Scrapie agent)的鼠脑、脾脏及胰腺中,受体蛋白表达量显著升高<sup>[1]</sup>。37kDa/67kDa LRP/LR 也称核糖体蛋白 SA(RPSA),是一种非整联蛋白的层黏蛋白结合蛋白,具有调节层黏蛋白与细胞之间相互作用的功能<sup>[2]</sup>。近来,朊病毒(PrP<sup>Sc</sup>)感染神经细胞的研究表明,37kDa/67kDa LRP/LR 对于朊病毒在神经细胞中的复制也是必需的。有研究发现针对 LRP/LR 的反义 RNA、小 RNA 干扰作用和抗 LRP/LR 抗体均降低 LRP/LR 的表达量,并随之阻断了朊病毒对神经细胞的侵袭作用<sup>[3]</sup>。另外,人小肠黏膜免疫组织化学研究证实人 Caco-2TC7 肠道细胞的牛源朊蛋白内化是通过 37kDa/67kDa LRP/LR 调节而进行的<sup>[4]</sup>,该结果进一步证实了 37kDa/67kDa LRP/LR 作为朊病毒蛋白受体,在朊病毒复制及内化过程中所起的决定性作用。近年来一些降低该蛋白水平的方法有望成为治疗朊病的新途径<sup>[5]</sup>。

朊病毒体内复制过程中,PrP<sup>Sc</sup>在一些组织中的复制程度较高,如中枢脑干的 Obex 及外周组织中的脾脏,相比较而言其它组织(如心肌、肺脏及肝脏)中的复制程度则较低<sup>[6]</sup>。某些学者称该现象为“朊病毒组织嗜性”。目前关于朊病毒组织嗜性的分子机制还不清楚,就病原-宿主间相互角度考虑,已有的研究结果发现宿主朊蛋白(PrP<sup>C</sup>)在体内的组织分布是影响朊病毒复制的一个方面<sup>[7]</sup>,然而宿主 PrP<sup>C</sup>在正常组织中的表达量并非绝对与朊病毒的复制水平呈正相关,相关研究表明某些组织或细胞中虽然 PrP<sup>C</sup>含量较高,但 PrP<sup>Sc</sup>复制水平较低<sup>[8]</sup>。显然,其它的朊病毒复制中所需的伴侣分子、蛋白影响此过程。而近年来越来越多的研究结果已证实 37kDa/67kDa LRP/LR 作为朊病毒重要受体,在朊病毒体外神经细胞及体内复制过程中都起着至关重要的作用,而且朊病毒含量较高的组织中该受体的表达量也相对较高<sup>[1, 3, 9]</sup>。这些结果说明组织中朊病毒受体 37kDa/67kDa LRP/LR 对于朊病毒的复制水平可能具有某些调控作用。目前关于朊病毒受体在组织中表达量的报道相对较少,本研究中,作者主要研究 37kDa/67kDa LRP/LR 在绵羊正常 11 个外周和中枢器官的组织特异性表达,为揭示朊病毒受体表达水平对组织中朊病毒复制水平的调控机制

提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

绵羊组织样品采集自内蒙古,包括心、肝、脾、肺、肾、肠系膜淋巴结、大脑、小脑、脑干、丘脑和海马,-80℃保存。

荧光定量 PCR SYBG Green I Kit (Tiangen)、Trizol RNA 提取试剂盒(Invitrogen)、M-MLV 反转录酶(Progema)、dNTP(TaKaRa)、<sup>Taq</sup> PCR Mast Mixture(Mylab)、<sup>Taq</sup> E (TaKaRa)、DEPC (Sigma)、Oligo(dT)(Progema)。实时荧光定量 PCR 仪器(DNA Engine Opticon™ 2 Continuous Fluorescence Detection System)、普通 PCR 仪 DNA Thermal Cycler (Mini Cycler® elite Thermal cycler, MJ Research, Waltham, USA)、低吸附吸头(Axygen)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物 根据 GenBank 中发表的 LRP/LR 及  $\beta$ actin 基因保守序列(Accession Number: EF649775 和 EF222474),利用 Primer 5.0 软件进行引物设计。目的基因 LRP/LR,上游:5'-TGGGCCTGATGTGGTGGATGC-3';下游:5'-GCTGAATGGGCACGGAAGGC-3',预计扩增片段为 270 bp;内参基因  $\beta$ actin,上游:5'-CTGTC-CCTGTACGCCTCT-3';下游:5'-GTGGTGGT-GAAGCTGTAG-3',预计扩增片段为 191 bp。为了避免基因组的污染,所用的特异引物根据已经发表的绵羊 LRR/LR 基因序列,跨越 LRP/LR 基因保守编码区 3 个外显子(第 4 外显子-第 6 外显子)。

1.2.2 组织 RNA 提取及反转录 RT-PCR 按照 RNA 试剂盒说明,从绵羊肠道组织中提取总 RNA,1  $\mu$ g 总 RNA 经 M-MLV 反转录被用于合成第一链 cDNA 模板。第一链 cDNA 合成的反应体积为 30  $\mu$ L,包括 5  $\mu$ L 总 RNA(5  $\mu$ g),1  $\mu$ L 随机引物(0.5  $\mu$ g  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>),65℃ 5 min 后,混合物立即置于冰上,然后加入反转录反应液,含 6  $\mu$ L 5  $\times$  buffer,1  $\mu$ L dNTPs(2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),200 U M-MLV 反转录酶,20 U RNasin Ribonuclease 及 12  $\mu$ L DEPC-treated 双蒸水;反应随后在 42℃ 作用 1 h,70℃ 孵育 10 min。cDNA 产物储存在-20℃ 备用。利用该模板进行普通 PCR,反应体系 20  $\mu$ L,包

括 10  $\mu\text{L}$   $T_{aq}$ Mix, 1  $\mu\text{L}$  上、下游引物, 6  $\mu\text{L}$  双蒸水, 2  $\mu\text{L}$  模板; 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 57.4、60.8  $^{\circ}\text{C}$  (分别为 LRP/LR 和  $\beta$ actin) 退火 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

**1.2.3 相对定量法标准曲线的构建及荧光定量 PCR 检测** 根据阳性重组质粒的  $OD_{260\text{nm}}$  值, 计算质粒浓度, 换算成拷贝数, 然后 10 倍梯度稀释 6 个等级, 分别记为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  拷贝  $\cdot$  反应 $^{-1}$ 。每个样品设 3 个重复, 然后进行荧光定量 PCR 检测。总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包含 9  $\mu\text{L}$  SYBR Green I Mix (2 $\times$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  上、下游引物 (10 pmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  cDNA 或质粒作为模板 (<10 ng  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 和 8.4  $\mu\text{L}$  双蒸水。6 个随机抽取的 RNA 样本未经过反转录作为阴性对照。荧光定量 PCR 步骤: 50  $^{\circ}\text{C}$  预热 1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57.4、60.8  $^{\circ}\text{C}$  (分别为 LRP/LR 和  $\beta$ actin) 退火 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 84  $^{\circ}\text{C}$  读板 1 s, 40 个循环, 延伸 20 s。分析扩增产物 (60~90  $^{\circ}\text{C}$ ) 溶解曲线。反应结束后, 系统软件自动生成溶解曲线及标准曲线。

**1.2.4 数据处理** 仪器根据对应的每个梯度的 Ct 值, 自动生成标准曲线, 每个样品的拷贝数由系统根据标准曲线自动计算得出。LRP/LR mRNA 相对含量为 LRP/LR 的拷贝数除以内参基因  $\beta$ actin 的拷贝数数值。数值记录为  $\bar{x} \pm s$ 。用 SPSS13.0 软件进行数据分析。数据分布检验利用 Kolmogorov-Smirnov normality test、One-Way analysis of variance 和  $t$ -test。One-Way ANOVA 用于分析不同器官之间 mRNA 的表达差异;  $P < 0.05$  视为差异显著。

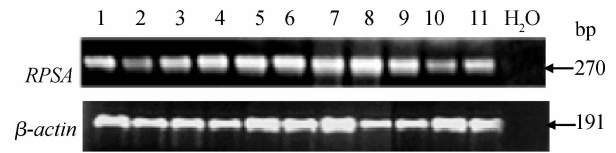
## 2 结果

### 2.1 LRP/LR、 $\beta$ actin 基因在 11 个组织的 PCR 扩增

从绵羊 11 个组织器官提取 RNA, 反转录, 以合成的 cDNA 为模板, 经特异性 LRP/LR、 $\beta$ actin 引物扩增, 在绵羊 11 个组织器官中均获得了预期目的基因 LRP/LR 及  $\beta$ actin 产物片段。大小分别为 270、191 bp (图 1)。

### 2.2 标准曲线的构建及相关系数

PCR 产物溶解曲线分析结果显示: 峰值单一, 各重复样品溶解点温度相同, 说明扩增产物特异, 无引物二聚体及其它非特异扩增子。RT-PCR 产物融解温度 LRP/LR 和  $\beta$ actin 分别为 89.0 和 89.7  $^{\circ}\text{C}$ 。基线设定后, 系统根据初始模板量对数与 Ct 值的线



1~11 分别为心、肝、脾、肺、肾、淋巴结、大脑、小脑、脑干、丘脑、海马

Expression of LRP/LR and  $\beta$ actin gene in 11 ovine organs demonstrated by RT-PCR amplification of mRNA transcripts. 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Mesenteric lymph nodes; 7. Neocortex; 8. Cerebellum; 9. Brain stem; 10. Thalamus; 11. Hippocampus

图 1 朊病毒受体 LRP/LR 基因及内参基因  $\beta$ actin 在绵羊各个组织中的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of RT-PCR amplification for the prion receptor-LRP/LR and housekeep gene  $\beta$ actin in the ovine tissues

性关系, 生成回归曲线。回归曲线方程如下, LRP/LR:  $y = 0.27x + 7.62$ ,  $r^2 = 0.999$ ;  $\beta$ actin:  $y = 0.23x + 7.51$ ,  $r^2 = 0.997$  (图 2a, 2b)。回归系数表明其构建的标准曲线中, 线性关系好, 同时平行组内变异率小于 5%。所有阴性对照均未出现可检测到的扩增产物。

### 2.3 朊病毒受体 mRNA 在绵羊各个组织的表达量

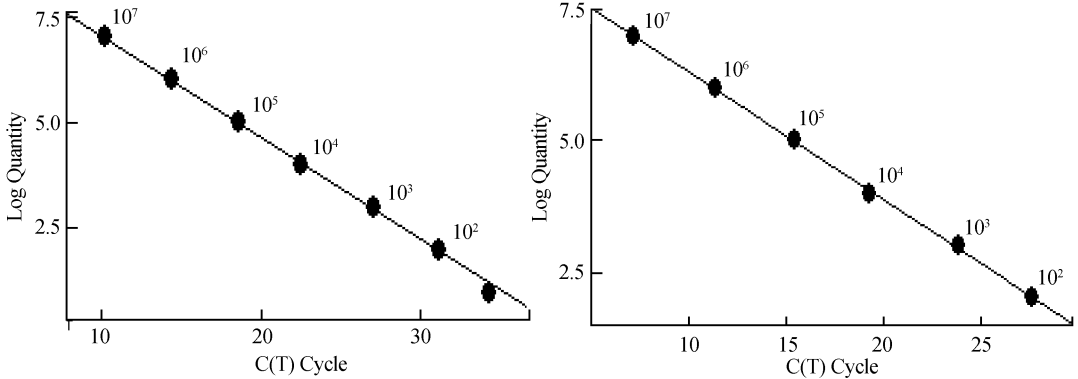
标准质粒及样品的实时荧光定量 PCR 结果表明, 同一 cDNA 模板在不同批次的荧光定量 PCR 循环中组间变化小于 5%, 同一 cDNA 模板同一批次的荧光定量 PCR 循环中组内差异小于 2.3%, 每一组单个器官和整体值平均数之间没有显著差异。因此, 来自 6 个动物的样本被认为是均一的, 可以满足数据分析需要。实时荧光定量 PCR 结果显示 LRP/LR 在绵羊各个组织中的 mRNA 相对表达量如表 1 所示。结果表明大脑皮质中的朊病毒受体 LRP/LR 表达水平最高 ( $P < 0.05$ ), 其次为心脏和脑干, 中等表达的器官依次为海马、小脑、脾脏、丘脑、肠系膜淋巴结、肝脏和肾脏, 表达量最低为肺脏 ( $P < 0.05$ )。总体来看, 除了中枢神经系统器官中的丘脑和外周器官中的心脏之外, 中枢神经组织的朊病毒受体 mRNA 表达水平高于外周器官 (表 1)。

## 3 讨论

37kDa/67kDa LRP/LR 在正常朊蛋白内化及朊病毒复制过程起着至关重要的作用, 因此了解朊

病毒受体在易感宿主组织中的表达情况将有助于更好地揭示该受体对朊病毒复制的调控机制。实时荧光定量 PCR 是一种精确定量基因表达水平的方法,对组织中即便是低水平的 mRNA 也能进行准确的定量<sup>[10-11]</sup>。在本研究中,为了避免样品处理过程中

人为造成的误差对初始模板量的影响,选用了相对荧光定量 PCR 方法。另外,为了排除基因组 DNA 的污染,设计目的基因 LRP/LR 引物时,跨越了编码区 3 个外显子(LRP/LR 基因组含有 7 个外显子,6 个内含子)。



a. LRP/LR 基因标准曲线; b.  $\beta$ -actin 基因标准曲线

a. Real-time RT-PCR of LRP/LR mRNA standard curve; b. Real-time RT-PCR of  $\beta$ -actin mRNA standard curve

图 2 LRP/LR 及  $\beta$ -actin 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of LRP/LR and  $\beta$ -actin mRNA constructed by Real-time RT-PCR

表 1 朊病毒受体 LRP/LR mRNA 在绵羊组织中的相对实时荧光定量 PCR 结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The results of LRP/LR mRNA transcription level in ovine tissues by Real-time RT-PCR

器官 Organs	LRP/LR mRNA 转录水平 LRP/LR mRNA transcription level
心脏 Heart	3.265 5 ± 0.285 8
肝脏 Liver	1.457 5 ± 0.151 5
脾脏 Spleen	2.455 8 ± 0.081 2
肺脏 Lung	0.015 1 ± 0.003 7
肾脏 Kidney	1.423 4 ± 0.040 6
肠系膜淋巴结 Mesenteric lympho node	1.514 3 ± 0.148 2
大脑 Neocortex	3.787 8 ± 0.194 5
小脑 Cerebellum	2.530 5 ± 0.254 3
脑干 Brain stem	2.872 9 ± 0.278 2
丘脑 Thalamus	1.616 7 ± 0.193 6
海马 Hippocampus	2.555 5 ± 0.214 7

本研究前期构建的荧光定量 PCR 标准曲线重复性和线性关系均较好,目的基因和内参基因的相关系数  $r^2$  均大于 0.995,可以保证后续基因检测结

果的准确性。荧光定量 PCR 研究结果显示,朊病毒受体基因广泛分布于绵羊各个组织器官,且在各个组织中 mRNA 表达水平各异。先前的研究结果已经证实 LRP/LR mRNA 水平与该受体蛋白表达水平呈正相关,即该受体 mRNA 表达量高低可直接代表该蛋白的表达量高低<sup>[9]</sup>。中枢器官中,大脑皮质处该受体表达量最高,这与最近的研究结果一致。该研究利用免疫组织化学和免疫印迹的方法也同样证实了在成年鼠脑中该受体的高表达<sup>[12]</sup>;表达量其次为心脏和脑干,表达量最低的为肺脏。值得注意的是,大脑皮质和脑干都是朊病毒感染动物中 PrP<sup>Sc</sup> 复制水平较高的区域<sup>[13-15]</sup>。外周器官中,受体表达量最高的为心脏,其次为脾脏和淋巴结,而对于朊病毒外周感染机制来说,脾脏和淋巴结也是 PrP<sup>Sc</sup> 复制程度较高的区域<sup>[16-17]</sup>。尽管作者的研究发现 LRP/LR 在肺脏中的表达水平很低,但是该结果与先前关于恶性肺癌人肺细胞研究中结果相一致,该研究也发现了肺脏中 LRP/LR 的表达<sup>[18]</sup>;另外,研究发现,肾脏及肝脏中 LRP/LR 的表达量较低,而这些器官中相对来说朊病毒的复制水平也较低。据报道肾脏及肝脏在某些炎性病变发生的时候,才会检测到朊病毒粒子<sup>[8]</sup>。

综上所述,朊病毒受体-LRP/LR 在绵羊各个组织中的表达量高低与朊病毒的复制程度有一定的相关性,LRP/LR 表达量较高的区域则朊病毒复制水平相对较高。作者推测朊病毒入侵机体后,组织器官 PrP<sup>Sc</sup> 聚集的易感性可能与 LRP/LR 表达水平相关。另外,LRP/LR 基因在各个组织的广泛分布及其在不同器官中的不同表达形式一定程度上证实了 LRP/LR 蛋白具有丰富的生物学调控功能。

#### 参考文献:

- [1] RIEGER R, EDENHOFER F, LASMEZAS C I, et al. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells[J]. *Nat Med*, 1997, 3(12):1383-1388.
- [2] HALL D E, FRAZER K A, HANN B C, et al. Isolation and characterization of a laminin-binding protein from rat and chick muscle [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(2):687-697.
- [3] LEUCHT C, SIMONEAU S, REY C, et al. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP<sup>Sc</sup> propagation in scrapie-infected neuronal cells [J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(3):290-295.
- [4] MOREL E, ANDRIEU T, CASAGRANDE F, et al. Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(4):1033-1042.
- [5] ZUBER C, LUDEWIGS H, WEISS S. Therapeutic approaches targeting the prion receptor LRP/LR[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 123(4):387-393.
- [6] BEEKES M, MCBRIDE P A. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies [J]. *FEBS J*, 2007, 274(3):588-605.
- [7] NING Z Y, ZHAO D M, YANG J M, et al. Quantification of prion gene expression in brain and peripheral organs of golden hamster by real-time RT-PCR [J]. *Anim Biotechnol*, 2005, 16(1):55-65.
- [8] AGUZZI A, HEIKENWALDER M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(10):765-775.
- [9] NELSON J, MCFERRAN N V, PIVATO G, et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease [J]. *Biosci Rep*, 2008, 28(1):33-48.
- [10] PFAFFL M W, GEORGIEVA T M, GEORGIEV I P, et al. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 22(2002):91-102.
- [11] MULLER A, HOMEY B, SOTO H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824):50-56.
- [12] MARCOS-CARCAVILLA A, CALVO J H, GONZALEZ C, et al. Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (RPSA): Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response [J]. *Mamm Genome*, 2008, 19(2):92-105.
- [13] JEFFREY M, GONZALEZ L. Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 284:65-97.
- [14] HERZOG C, SALES N, ETCHEGARAY N, et al. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection[J]. *Lancet*, 2004, 363(9407):422-428.
- [15] CAPLAZI P, O'ROURKE K, WOLF C, et al. Biology of PrP<sup>Sc</sup> accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2004, 16(6):489-496.
- [16] UNTERBERGER U, VOIGTLANDER T, BUDKA H. Pathogenesis of prion diseases[J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 109(1):32-48.
- [17] MABBOTT N A, MACPHERSON G G. Prions and their lethal journey to the brain[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(3):201-211.
- [18] FONTANINI G, VIGNATI S, CHINE S, et al. 67-Kilodalton laminin receptor expression correlates with worse prognostic indicators in non-small cell lung carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(2):227-231.