

胚胎晚期暴露脂多糖对中年 CD-1 小鼠背侧海马 SUMO-3 含量的影响

杨启纲¹, 陈贵海^{2*}

(1. 安徽医科大学第一附属医院重症医学科, 合肥 230022;

2. 安徽医科大学附属巢湖医院神经内科和全科医学科, 合肥 238000)

摘要: 为探讨胚胎晚期暴露细菌脂多糖 (LPS) 的中年 CD-1 小鼠背侧海马的类泛素化蛋白 (SUMO-3) 含量有无年龄相关性改变。采用免疫组织化学技术检测 LPS 暴露组和对照组 CD-1 小鼠背侧海马 DG 区、CA1 区和 CA3 区各亚层的 SUMO-3 表达。结果表明, 两组间各区各亚层的 SUMO-3 含量无明显差异。

关键词: 细菌脂多糖; 免疫组织化学; 背侧海马; 类泛素化蛋白

中图分类号: R338.64; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)02-0214-04

Effects of lipopolysaccharide on the SUMO-3 levels in dorsal hippocampus of middle-aged CD-1 mice during late embryon

YANG Qigang¹, CHEN Guihai²

(1. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

2. Department of Neurology and General Practice, Chaohu Hospital Affiliated of Anhui Medical University, Hefei 238000)

Abstract: To explore the SUMO-3 levels in different subregions of dorsal hippocampus (DH) in the middle-aged CD-1 mice, we used immunohistochemical method to detect the expression of SUMO-3 in different DH subregions. The results showed that, in all sublayers of hippocampal DG, CA1 and CA3 regions, the SUMO-3 level of LPS-group was similar to those in the middle-aged mice of the control-group. There were no significant differences between the two groups in each sublayer of DG, CA1 and CA3 regions.

Key words: bacterial lipopolysaccharide; immunohistochemical method; dorsal hippocampus; small ubiquitin-related modifier-3

细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 又称细菌内毒素, 是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要毒性成分。在人体免疫系统对抗细菌入侵时, LPS 通过激活小胶质细胞、星形胶质细胞和血管内皮细胞, 产生大量的炎性细胞介质和自由基, 引起神经细胞损伤。大量的动物实验研究已证实胚胎期暴露 LPS 可能是发生阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的内在或易感性增加的原因^[1-3]。

泛素相关小修饰蛋白 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 是一类在物种进化过程中高度保守的小蛋白。SUMO 化 (SUMOylation) 属于类泛

素化, 是 SUMO 分子结合到特异底物的蛋白质翻译后修饰过程。较多的研究表明 SUMO 与 AD 发病密切相关, SUMO 参与 tau 和 APP 蛋白的 SUMO 化修饰^[4-5], APP 的 SUMO 化可以减少 A β 聚集。但是迄今为止, 有关 SUMO-2/3 的过度表达究竟是促进还是降低 APP 和 A β 的形成仍存争议^[6-7]。前期的行为学研究已发现胚胎期暴露 LPS 的 CD-1 小鼠中年期提前出现空间学习记忆能力衰退的现象^[8]。因此, 本研究拟探讨 SUMO-3 蛋白含量是否同时发生改变, 可能有助于阐明与 AD 密切相关的学习记忆能力减退机制。

收稿日期: 2017-01-12

基金项目: 国家自然科学基金 (81370444) 和安徽省高校自然科学基金项目 (KJ2015A126) 资助。

作者简介: 杨启纲, 博士, 副主任医师。E-mail: yhyqg@126.com

* 通信作者: 陈贵海, 主任医师, 教授, 博士生导师。E-mail: chenguihai1964@163.com

1 材料与方法

1.1 动物和材料

清洁级 CD-1 小鼠 (7~8 周) 购于北京维通利华实验动物公司。适应性喂养 1 周后交配 (自由饮食, 明暗期均衡, 温度 20~25℃, 湿度 (50±5)%。取 18 只受孕 CD-1 小鼠随机分为 2 组。LPS 组小鼠在孕 15~17 d 每天经腹腔注射 LPS (50 μg·kg⁻¹)。对照组小鼠同期经腹腔注射等容积生理盐水。经正常的孕期分娩和哺乳期, 从每窝随机各取 2 只子鼠 (雌雄各半), 每组各得 18 只。各组分雌、雄鼠群养 (4~5 只·笼⁻¹), 喂养至 400 日龄, 最后样本量为 LPS 组 14 只 (8 雄 6 雌), 对照组 15 只 (8 雄 7 雌)。完成行为学评估后处死小鼠, 分离海马, 制作蜡块和组织芯片为实验材料。

1.2 主要实验试剂和仪器

LPS (Sigma, 美国); 兔源抗 SUMO-3 蛋白多克隆抗体 (ZYMED, 美国); 生物素标记羊抗兔 IgG S-P 超敏试剂盒 (SP-9001, 北京中杉); DAB 显色试剂盒 (AR1022, 武汉博士德); 组织芯片点样仪及配套点样针 (内径 1.0 mm); 光学显微镜 (Nikon, 日本)。

1.3 脑标本组织芯片制备

完成行为学测试后 15 d 将 CD-1 小鼠颈动脉白处死, 冰上迅速开颅取脑, 4% 多聚甲醛溶液中固定、常规蜡块包埋, HE 染色定位 (染出小鼠海马), 制作含海马结构的组织芯片, 连续冠状位切片, 片厚 4 μm。

1.4 免疫组织化学显色

采用超敏 S-P 法行免疫组织化学检测。经过切片脱蜡、水化和热修复, 兔血清液 37℃ 下封闭 12 min 后, 每张切片滴加适量 SUMO-3 多克隆抗体 (1:400), 4℃ 孵育过夜。次日先后滴加适量生物素标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 37℃ 下分别孵育 20 min。冲洗后 DAB 显色, 中性树脂封片。阴性对照为 PBS 代替 SUMO-3; 阳性对照为已知 SUMO-3 的切片结果。

1.5 摄片与图像分析

观察组织切片免疫组化染色情况, 先用低倍镜 (4×10 倍) 观察并拍摄海马整体, 然后用高倍镜 (40×10 倍) 依次拍摄海马的 DG 区 (门区 HL、颗粒细胞层 GL 和分子层 ML)、CA1 区 (ML、放射层 RL、锥体细胞层 PL 和起层 OL) 和 CA3 区 (OL、PL、透明层 SL 和 ML) 图像, 用图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, 美国) 对

DG、CA1 和 CA3 区 SUMO-3 免疫反应产物图片进行光密度值 (optical density, OD) 测定和分析。由于每个标本各层选取的形状大小各异, 故以平均 OD (累积 OD 与选取面积的比值) 作为 SUMO-3 的相对水平指标。

1.6 统计学处理

符合正态分布的数据采用独立样本 Student *t* 检验 LPS 组和对照组 CD-1 小鼠背侧海马 DG 区和 CA1 区各亚层 SUMO-3 相对含量的组间差异。非正态分布资料采用两独立样本 Mann-Whitney U 检验。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。所有分析由 SPSS 16.0 统计软件完成。统计学结果以 Origin 8.0 制图软件制作。

2 结果与分析

图 1 背景均为淡黄色。阴性对照的脑组织染色与背景色接近, 未见特异性着色; 阳性对照可见特异性 SUMO-3 蛋白免疫反应, 镜下阳性着色呈有一定分布特点的不均匀棕褐色至棕黄色斑块状结构。由图 1 可见 LPS 组和同龄对照组大体及各亚区着色差异不明显。

在中年期 LPS 组 CD-1 小鼠背海马 DG、CA1 和 CA3 区各亚层中 SUMO-3 相对含量与同龄对照组小鼠相似 (见图 2)。进一步分析显示在背海马 DG 的门区、颗粒细胞层、分子层和 CA1 区的起层、锥体细胞层、放射层、分子层, CA3 区的起层、锥体细胞层、透明细胞层和分子层, 400 日龄 CD-1 小鼠 LPS 组 SUMO-3 的相对含量与同龄对照组之间的差异无统计学意义 ($P_s > 0.05$)。

3 讨论

“成人疾病胎源”学说认为许多成年慢性疾病起源于人类生命早期 (尤其胚胎期) 的不良因素暴露^[9], 即当胎儿期宫内微环境发生改变时, 处于发育敏感期的胎儿组织器官在结构和功能上会发生永久性或程序性基因改变, 这些变化大大增加了个体对某些成年或老年相关性疾病 (如 AD 等) 的易感性^[10]。作为以记忆力下降为特征性改变的最常见的神经系统退行性疾病如 AD 的病理改变首先出现于海马-内嗅皮层^[11]。在啮齿类, 海马分为腹海马和背海马, 后者与空间学习和记忆密切相关, 并且在衰老过程中更容易受损^[12]。

由于 LPS 是公认的炎症刺激剂, 已有大量研究证实 SUMO 极有可能通过 LPS 介导的 NF-κB 和 MAPK 信号转导通路参与了 AD 发病过程^[13-14]。目

前已发现 4 种 SUMO 亚型, 分别为 SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3 和 SUMO-4, 其中 SUMO-2 与 SUMO-3 的氨基酸序列有 97% 相似性 (通常被称为 SUMO-2/3)^[15]。SUMO-2/3 在通常情况下主要是以

游离的形式存在。当机体受到外界的刺激后, 游离的 SUMO-2/3 便会结合到底物蛋白上; 当刺激消除后, SUMO-2/3 又会从底物蛋白上解离下来^[16], 从而保证了机体能够对外界刺激作出快速应答。

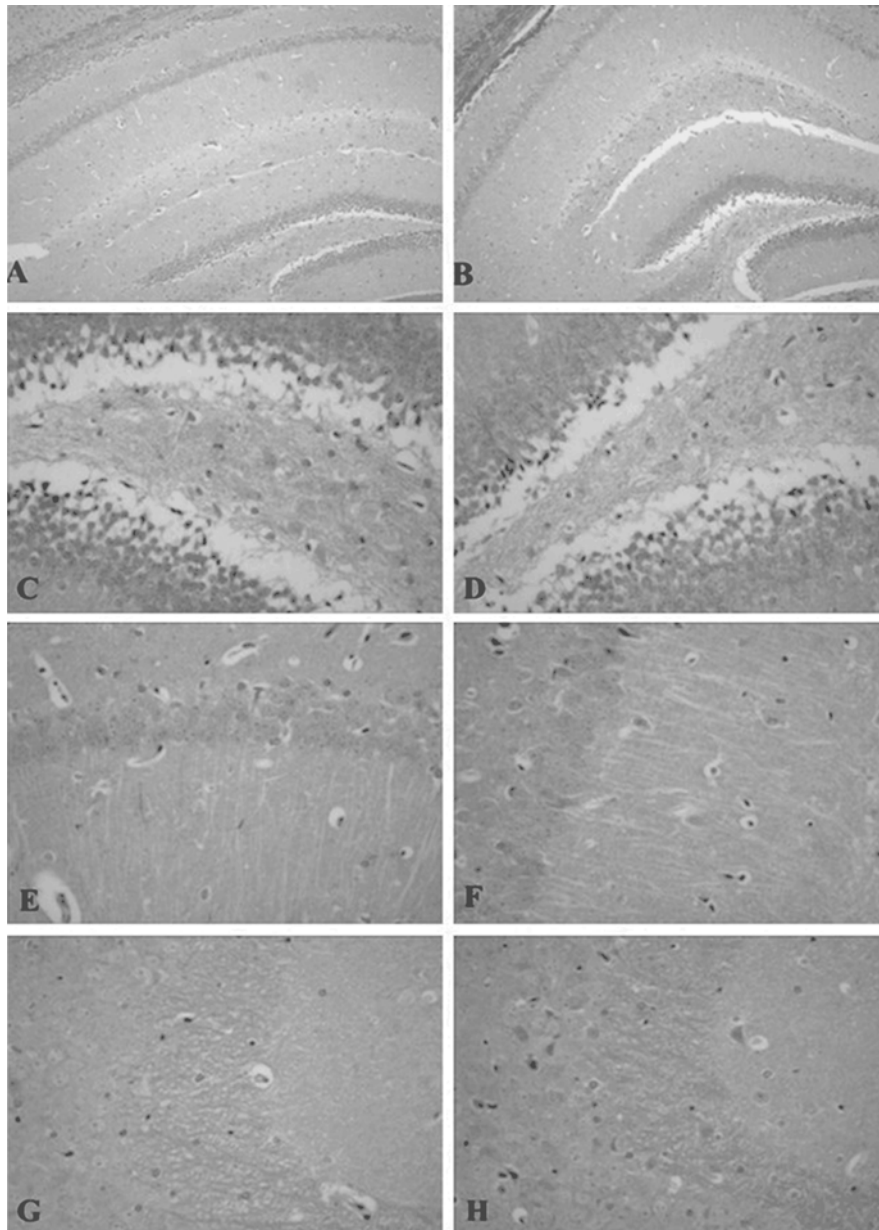


图 1 胚胎晚期暴露 LPS 或生理盐水的 CD-1 小鼠背侧海马 SUMO-3 蛋白的表达。A 和 B 分别为 LPS 组和对照组 CD-1 小鼠背侧海马大体显色情况 (SP×40); C 和 D 分别为 LPS 组和对照组背侧海马 DG 区 (SP×400); E 和 F 分别为 LPS 组和对照组背侧海马 CA1 区 (SP×400); G 和 H 分别为 LPS 组和对照组背侧海马 CA3 区 (SP×400)

Figure 1 The expression of SUMO-3 in dorsal hippocampus (DH) of CD-1 mice for exposure to lipopolysaccharide or saline during late embryo. Low-magnification images of DH (A-B; 40 ×) and high-magnification images of DH-DG (C-D), DH-CA1 (E-F), and DH-CA3 (G-H) (400 ×) subregions are shown. Scale bar = 400 μm (A-B), 50 μm (C-H)

本研究中, 发现经母体孕晚期暴露 LPS 处理的中年期 CD-1 子鼠 SUMO-3 含量与同龄对照组相比并无明显变化, 与以往的研究结果^[17]不同。因此结合既往文献报道^[18-20], 分析其中可能的原因如下: 本实验中未做年龄效应的比较, 只是处理效应的比

较; 方法学不一致, 以往的研究采用的是蛋白质印迹技术, 检测的是游离型的 SUMO-3, 而本实验采用的是免疫组织化学技术, 检测的是游离型和结合型的 SUMO-3, 因此并不能排除低剂量的 LPS 可能已对 SUMO-3 产生了影响, 虽未出现 SUMO-3 总量

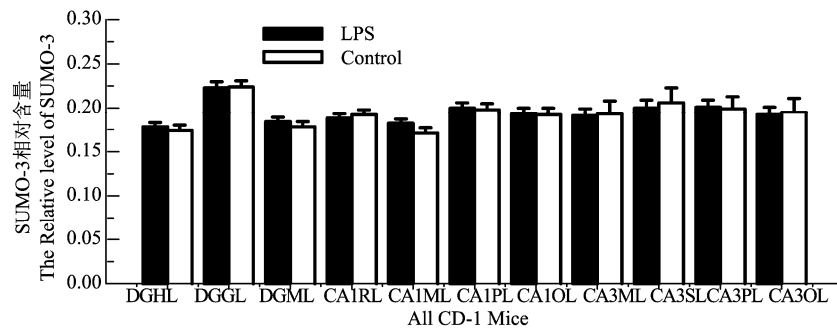


图 2 胚胎晚期暴露 LPS 或生理盐水的中年 CD-1 小鼠背侧海马 SUMO-3 蛋白相对含量。CD-1 小鼠 LPS 处理组和同龄对照背侧海马 DG 门区 (DG-HL)、颗粒细胞层 (DG-GL)、分子层 (DG-ML) 和 CA1 起层 (CA1-OL)、锥体细胞层 (CA1-PL)、放射层 (CA1-RL)、分子层 (CA1-ML) 和 CA3 区分子层 (CA3-ML)、透明层 (CA3-SL)、锥体细胞层 (CA3-PL) 和起层 (CA3-OL) SUMO-3 的组间效应 ($P_s > 0.05$)

Figure 2 The relative amount of SUMO-3 in dorsal hippocampus (DH) of adult CD-1 mice of exposure to lipopolysaccharide or saline during late embryon. The LPS-group mice exhibited no significant difference from the control-group mice in the DH subfields, including the DG-(GL and ML), CA1-(ML, RL and PL), and CA3-(OL, PL, SL and ML) ($P_s > 0.05$). The error bars standing right represent for S.E.M.

的改变,但由于 LPS 的作用,使得 SUMO 化过程增加,去 SUMO 化过程减少,可能这种影响仅仅局限在游离型和结合型 SUMO-3 比例改变,由此参与了 LPS 组中年期子鼠认知功能减退;还有一种解释可能为低剂量 LPS 可能已对其他 SUMO 亚型产生影响,但尚未对 SUMO-3 表达产生影响;或者是 SUMO-3 改变实际出现在中年期以后。因此本研究推测:虽然经过胚胎期暴露 LPS 的中年 CD-1 子鼠脑内未发现 SUMO-3 总含量改变,但不排除其结合状态已发生改变。

参考文献:

- GOLAN H M, LEV V, HALLAK M, et al. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy [J]. *Neuropharmacology*, 2005, 48(6): 903-917.
- HAO L Y, HAO X Q, LI S H, et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats [J]. *Neuroscience*, 2010, 166(3): 763-770.
- WANG H, MENG X H, NING H, et al. Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 192(2): 245-251.
- TAKAHASHI K, ISHIDA M, KOMANO H, et al. SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(1): 90-93.
- ZHANG Y Q, SARGE K D. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates A β aggregate levels [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 374(4): 673-678.
- LI Y, WANG H, WANG S, et al. Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 259-264.
- DORVAL V, MAZZELLA M J, MATHEWS P M, et al. Modulation of Abeta generation by small ubiquitin like modifiers does not require conjugation to target proteins [J]. *Biochem J*, 2007, 404(2): 309-316.
- CHEN G H, WANG H, YANG Q G, et al. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 218(2): 267-279.
- BARKER D J. Developmental origins of adult health and disease [J]. *J Epidemiol Commun H*, 2004, 58(2): 114-115.
- CALKINS K, DEVASKAR S U. Fetal origins of adult disease [J]. *Curr Prob Pediatr Ad*, 2011, 41(6): 158-176.
- BURKE S N, BARNES C A. Neural plasticity in the ageing brain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 30-40.
- SMALL S A, CHAWLA M K, BUONOCORE M, et al. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18): 7181-7186.
- AILLET F, LOPITZ-OTSOA F, EGAÑA I, et al. Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I κ B α degradation and NF- κ B activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51672.
- AGUIRRE R S, KARPEN S J. Inflammatory mediators increase sumoylation of retinoid x receptor α in a c-jun n-terminal kinase-dependent manner in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2013, 84(2): 218-226.
- SARGE K D, PARK-SARGE O K. SUMO and its role in human diseases [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011, 288(2): 167-183.
- SAITOH H, HINCHEY J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6252-6258.
- YANG Q G, WANG F, ZHANG Q, et al. Correlation of increased hippocampal Sumo3 with spatial learning ability in old C57BL/6 mice [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 518(2): 75-79.
- YANG W, SHENG H, WARNER D S, et al. Transient global cerebral ischemia induces a massive increase in protein sumoylation [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2008, 28(2): 269-279.
- CIMAROSTI H, LINDBERG C, BOMHOLT S F, et al. Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 54(2): 280-289.
- JA LEE Y, CASTRI P, BEMBRY J, et al. SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance [J]. *J Neurochem*, 2009, 109(1): 257-267.