

激活素受体相互作用蛋白 1 在小鼠组织中的表达与分布

刘海岩 葛敬岩 陈芳芳 台桂香 柳忠辉*

(吉林大学基础医学院 吉林省神经免疫重点实验室 长春 130021)

摘要: 激活素具有调节激素分泌以及神经保护等多种作用,最近在小鼠脑内发现的激活素受体相互作用蛋白 1 (ARIP1)具有介导激活素信号传导作用,但有关 ARIP1 的分布情况仍然不清楚。本研究采用 RT-PCR 及免疫组织化学染色分析 ARIP1 在脑及脑外的表达与分布情况。RT-PCR 检测发现 ARIP1 mRNA 不仅在大脑、小脑表达,在垂体、肾上腺以及睾丸也有明显表达。免疫组化染色显示大脑、小脑、垂体、肾上腺和睾丸均有不同程度的 ARIP1 免疫染色反应,小脑中浦肯野细胞着色明显,大脑主要是海马和下丘脑,在神经垂体、腺垂体的嗜碱细胞以及肾上腺网状带、球状带、束状带中均有表达,睾丸间质细胞也可见 ARIP1 成熟蛋白表达。结果提示,ARIP1 不仅参与脑神经细胞的信号传导调节,也可能参与神经内分泌腺的功能调节。

关键词: ARIP1; mRNA; 表达; 分布; 脑

中图分类号: R742, R392 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)01-26-05

Messenger RNA Expression and Protein Distribution of Activin Receptor interacting Protein 1 in Mouse Tissues

LIU Hai-Yan GE Jing-Yan CHEN Fang-Fang TAI Gui-Xiang LIU Zhong-Hui*

(School of Basic Medical Sciences, Jilin University, The Key Laboratory of Neuroimmunology of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: Activin plays an essential role in the neuroprotection as a nerve survival factor. Activin receptor interacting protein1 (ARIP1) has been recently discovered in mouse brain as a regulator of activin signal transduction, however, its distribution pattern is not well characterized. In this study, the expression of ARIP1 mRNA and localization of mature ARIP1 protein in mouse tissues were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. ARIP1 mRNA expression was detectable in cerebrum, cerebellum, extra brain tissues such as pituitary, adrenal gland and testis. Immunohistochemical analysis showed that ARIP1 like immunoreactivity protein was mainly localized in hypothalamus and hippocampus of the cerebrum, Purkinje cells of the cerebellum, neurohypophysis and basophilic cells of adenohypophysis of the pituitary, adrenal cortex of the suprarenal gland, and Leydig cells of the testis. These data suggest that ARIP1 may participate in not only the regulation of activin signal transduction of nerve cells, but also the regulation of function in neural endocrine gland.

Key words: ARIP1; Messenger RNA; Expression; Distribution; Brain

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30440044, 30170298, 30170478);

* 通讯作者, E-mail: zh_liu2001@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 刘海岩,男,博士研究生;研究方向:神经免疫学; E-mail: haiyan@jlu.edu.cn.

收稿日期: 2007-05-14, 修回日期: 2007-11-14

激活素(activin)属于转化生长因子 β (TGF β)超家族成员的多功能生长和分化因子,具有促进垂体前叶腺细胞分泌促性腺激素、诱导中胚层发育以及抑制活化巨噬细胞分泌 NO 等作用^[1-5]。激活素作为影响神经细胞生存的因子,还具有维持神经细胞生存等神经保护作用^[5]。激活素生物学作用存在明显的组织学特异性,可能与其受体介导的信号传导差异有关。研究表明激活素受体属于丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶型受体^[6,7],分为 I 型受体(ActR I)及 II 型受体(ActR II)。激活素首先与 II 型受体结合形成复合体,导致 II 型受体的变构,再激活 I 型受体,进而将信号转入细胞核,因此 I 型受体与 II 型受体复合物的形成是激活素细胞内信号传导所必须的。最近的研究揭示,在细胞内存在一组新的激活素信号传导调控蛋白,命名为激活素受体相互作用蛋白(activin receptor-interacting protein, ARIP), ARIPs 可特异结合激活素 II 型受体,调控激活素诱导的细胞内信号传导^[8-11]。Northern 杂交显示 ARIP1 mRNA 主要在脑表达,因此,ARIP1 在神经细胞的信号调节方面可能有着十分重要的意义^[8]。我们的研究显示,ARIP1 mRNA 在脑外器官也有表达,因此,本研究采用 RT-PCR 和免疫组织化学染色,对 ARIP1 在脑及脑外器官的表达、分布情况做进一步研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及实验动物 C57BL/6 小鼠及新西兰白兔由吉林大学动物部提供。一步法 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。免疫组化用 SP 超敏试剂盒购自福建迈新公司。

1.2 兔抗 ARIP1 抗体制备 按照文献^[11]的方法,利用重组表达质粒 pGEX-4T-1-ARIP1 制备 GST-ARIP1 融合蛋白。采用 GST-ARIP1 融合蛋白作为抗原免疫家兔 3 次,常规采集抗血清。Protein A 蛋白亲和层析分离 IgG,再经 GST-Sepharose 4B 亲和层析除去抗 GST 抗体,最终获

得纯化的兔抗 ARIP1 的 IgG 型抗体。该抗体与 ARIP2 分子无交叉反应,抗体以 1 mg/ml 浓度保存在 25% 甘油中。

1.3 RT-PCR 检测组织 ARIP1 mRNA 表达

小鼠颈椎脱臼处死后,立即以 4℃ 预冷的 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS) 100 ml 心灌注,冲洗脏器,迅速分离大脑、小脑、心、肝、肺、脾、肾、睾丸、胰腺、卵巢及胸腺组织,加入 Trizol 试剂,按试剂说明书提取总 RNA。分别取各种组织总 RNA 1 μ g,根据 GenBank: AB029485 的 ARIP1 基因序列设计特异引物(上游: 5'-ttg gac tac agg cag cac tct 3',下游: 5'-ggt tgc tgc tgc ctt tag ggt 3'),采用 TaKaRa 公司的一步法 RT-PCR 试剂盒扩增 ARIP1 特异 cDNA,以 GAPDH 作为内参照(上游引物: 5'-gat tgt tgc cat caa cga cc 3',下游引物: 5'-gtg cag gat gca ttg ctg ac 3')。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,利用 Pharmacia Biotech 影像分析仪(ImageMaster VDS)检测目的 cDNA。

1.4 免疫组织化学染色 根据 mRNA 检测结果,取小鼠大脑、小脑、垂体、肾上腺、睾丸及肺,4% 多聚甲醛固定 48 h,常规石蜡切片,石蜡切片经二甲苯常规脱蜡(10 min \times 2 次)、梯度酒精(无水酒精 5 min \times 2 次,95%、90%、80%、70% 酒精 5 min 各一次)水化后,PBS 洗涤 2 次,采用 SP 超敏试剂盒进行染色,一抗使用纯化的兔抗 ARIP1 多克隆抗体(1:100 稀释),4℃ 过夜,DAB 显色,切片经苏木精复染,自来水冲洗,常规梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,树脂封片,光学显微镜观察。实验以未免疫兔血清 IgG 做阴性对照,实验操作同抗体组。

2 结果

2.1 ARIP1 mRNA 在小鼠组织的表达 采用 RT-PCR 检测不同组织 ARIP1 mRNA 表达。结果显示,ARIP1 在大脑、小脑、肾上腺中明显表达,在垂体以及睾丸也有表达,其他器官未见表达(图 1)。

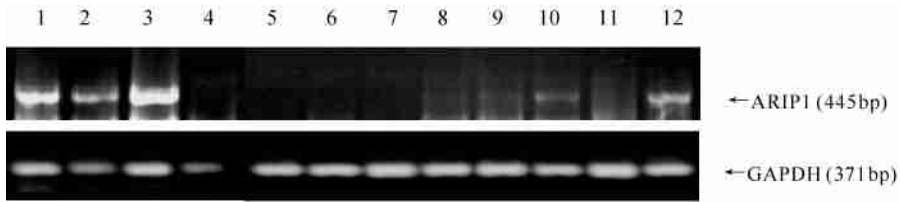


图 1 ARIP1 mRNA 在不同组织中的表达

Fig. 1 The expression of ARIP1 mRNA in various tissues as revealed by RT-PCR

1. 小脑; 2. 垂体; 3. 大脑; 4. 脾; 5. 心; 6. 肾; 7. 肝; 8. 胰腺; 9. 卵巢; 10. 睾丸; 11. 肺; 12. 肾上腺。
 1. Cerebellum; 2. Pituitary; 3. Cerebrum; 4. Spleen; 5. Heart; 6. Kidney; 7. Liver; 8. Pancreas;
 9. Ovary; 10. Testis; 11. Lung; 12. Adrenal gland.

2.2 免疫组织化学染色 采用抗 ARIP1 抗体进行免疫组织化学染色, 观察 ARIP1 在各种器官中的表达。结果显示, ARIP1 不仅在大脑海马、丘脑区及小脑的蒲肯野细胞有明显表达, 而且在肾上腺网状带、球状带、束状带中均有表达, 神经垂体、腺垂体以及睾丸的间质细胞也有明显 ARIP1 着色反应, 而在肺中未见明显的 ARIP1 着色反应。这一结果与上述 RT-PCR 检测结果一致(表 1、图版 I)。

3 讨论

2000 年首先由 Shoji 报道了新的激活素受体胞内信号传导调控蛋白 ARIP1^[8]。至今已经先后发现 ARIPs 存在 4 种以上分子形式, mRNA 检测结果显示 ARIPs 存在明显的组织学分布差异^[8~11]。ARIP1 是从小鼠脑 cDNA 文库中克隆出来的新基因, 在其 N 末端有一个鸟苷酸激酶区, 连接两个 WW 区和 5 个 PDZ 样功能区, ARIP1 通过 PDZ5 功能区与激活素 II A 型受体 (ActR II A) 相互作用, 同时借助 WW 功能区与 Smad3 结合, ARIP1 的过量表达在激活素作用的细胞系中能抑制激活素诱导以及 Smad3 诱导的基因转录^[8,9]。ARIP1 可能以脚手架方式一方面与激活素受体结合, 另一方面与 Smad3 结合, 参与激活素胞内信号传导的生理调节^[6]。Northern 杂交显示 ARIP1 mRNA 主要在脑神经组织中表达, 因此, ARIP1 在特定亚细胞位点激活素信号分子的装配以及神经细胞的信号调节方面有着十分重要的意义^[8]。

表 1 小鼠 ARIP1 mRNA 及蛋白的分布

Table 1 Messenger RNA expression and protein distribution of activin receptor interacting protein1 in mouse

器官 Organ	mRNA	蛋白 Protein
睾丸 Testis	+	
睾丸间质细胞 Leydig cells		+
精原细胞 Spermatogenic cells		-
支持细胞 Sertoli cells		-
肾上腺 Adrenal gland	+	
球状带 Zona glomerulosa		+
网状带 Reticular zone		+
束状带 Fascicular zone		+
垂体 Pituitary	+	
神经垂体 Neurohypophysis		+
腺垂体 Adenohypophysis		+
大脑 Cerebrum	+	
下丘脑 Hypothalamus		+
海马 Hippocampus		+
小脑 Cerebellum	+	
浦肯野细胞 Purkinje cells		+
其他细胞 Others		-
肺 Lung	-	-
脑干 Brain stem	+	ND
心 Heart	-	ND
脾 Spleen	-	ND
肾 Kidney	-	ND
肝 Liver	-	ND
胰腺 Pancreas	-	ND
卵巢 Ovary	-	ND
胸腺 Thoracic gland	-	ND

ND: 未检测。ND: Not detected.

本研究发现, ARIP1 mRNA 不仅在脑(大脑、小脑)表达, 在脑外部分腺体如垂体、肾上腺及睾丸也有表达。为了检测这些器官是否存在 ARIP1 成熟蛋白表达及其在脑及脑外组织的分

布格局, 本研究进一步采用重组 ARIP1 融合蛋白免疫家兔, 制备了针对 ARIP1 的特异抗体, 利用制备的抗 ARIP1 抗体进行免疫组织化学染色。结果显示, 与 ARIP1 mRNA 表达情况相似, 在脑(大脑、小脑)及脑外部分腺体如垂体、肾上腺及睾丸均有 ARIP1 免疫染色反应, 而在肺同样未检测到 ARIP1 成熟蛋白表达。进一步的分析表明, ARIP1 成熟蛋白在小脑主要是蒲肯野细胞表达, 大脑主要分布在下丘脑和海马, 神经垂体和腺垂体、肾上腺皮质以及睾丸的间质细胞均有不同程度的表达。

本研究发现 ARIP1 不仅在大脑、小脑中表达, 在脑外部分腺体也有不同程度表达, 这一结果提示 ARIP1 不仅在神经组织中参与激活素神经保护作用的信号传导调节过程, 在下丘脑-垂体-肾上腺轴以及睾丸功能调节中也可能发挥重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Kamamanu C, Yasuda H, Fujita T. Involvement of Smad proteins in TGF β and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells. *Hepatol Res*, 2002, **23**: 211~219.
- [2] Liu Z H, Shintani Y, Sakamoto Y, *et al.* Effects of LHRH, FSH and activin A on follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr J*, 1996, **43**: 321~ 327.
- [3] Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a new activin β subunit: a dorsal mesoderm inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **210**: 581~ 588.
- [4] Thomsen G, Woolf T, Whitman M, *et al.* Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell*, 1990, **63**: 485~ 493.
- [5] Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, *et al.* Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature*, 1990, **344**: 868~ 870.
- [6] Tsuchida K, Matsuzaki T, Yamakawa N, *et al.* Intracellular and extracellular control of activin function by novel regulatory molecules. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, **180**: 25~ 31.
- [7] Attisano L, Silvestri C, Izzi L, *et al.* The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGF β and activin signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, **180**: 3~ 11.
- [8] Shoji H, Tsuchida K, Kishi H, *et al.* Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 5 485~ 5 492.
- [9] Tsuchida K, Nakatani M, Matsuzaki T, *et al.* Novel factors in regulation of activin signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **225**: 1~ 8.
- [10] Matsuzaki T, Hanai S, Kishi H, *et al.* Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Raf/Raf binding protein F dependent pathway. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 19 008~ 19 018.
- [11] Liu Z H, Tsuchida K, Matsuzaki T, *et al.* Characterization of isoforms of activin receptor interacting protein 2 that augment activin signaling. *J Endocrinol*, 2006, **189**: 409~ 421.

图 版 说 明

成熟 ARIP1 蛋白在小鼠组织中的分布

A. 大脑 \times 100; B. 小脑 \times 400; C. 神经垂体 \times 400; D. 腺垂体 \times 400; E. 肾上腺 \times 400; F. 睾丸 \times 400; G. 肺 \times 400; H. 阴性对照睾丸 \times 100; 箭头所指为阳性细胞。A、H. 标尺= 100 μ m; B~ G 标尺= 50 μ m。

Explanation of Plate

Tissue distribution of mature ARIP1 protein in mouse

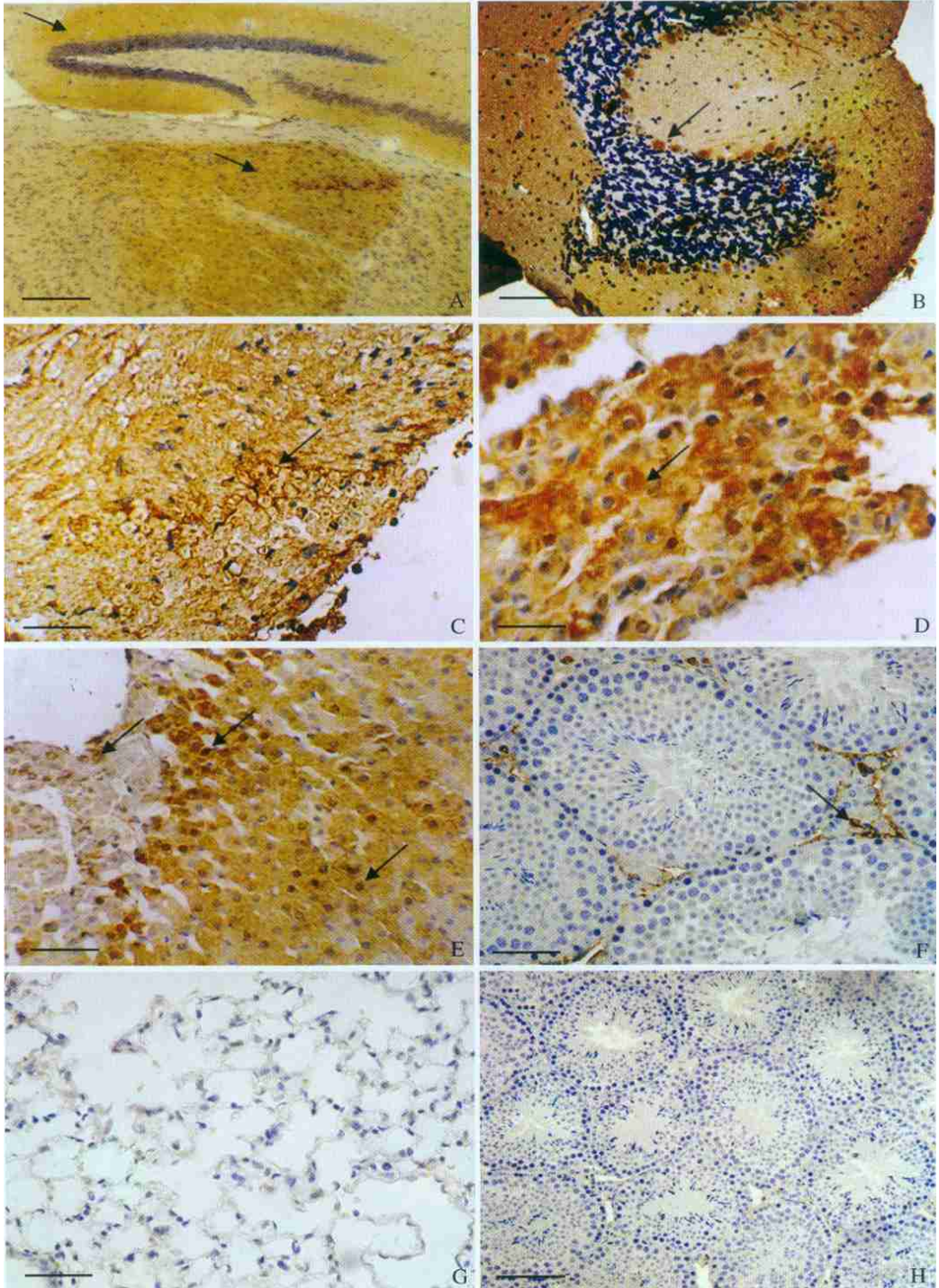
A. Cerebrum \times 100; B. Cerebellum \times 400; C. Pituitary \times 400; E. Adrenal gland \times 400; F. Testis \times 400; G. Lung; H. Negative control testis \times 100. The arrowhead points at positive cells. A, H. Bar= 100 μ m; B- G Bar= 50 μ m.

刘海岩等: 激活素受体相互作用蛋白 1 在小鼠组织中的表达与分布

图版 I

LIU Hai-Yan *et al.*: Messenger RNA Expression and Protein Distribution of
Activin Receptor-interacting Protein 1 in Mouse Tissues

Plate I



图版说明见文后