

染色体免疫沉淀法探寻小鼠脑缺血后Smad3信号蛋白与Lcn2的结合位点

孔丽萍¹ 曹晓伟¹ 娄世莹¹ 张清秀^{2*}

1. 徐州矿务集团总医院(徐州医科大学附属第二医院) 江苏 徐州 221006

2. 南京鼓楼医院 江苏 南京 210008

摘要:目的:在典型的Smad2/3通路中,明确小鼠脑缺血后Smad3信号蛋白与Lcn2基因结合的位点,为研究星形胶质细胞介导的神经炎症反应提供重要依据和视角。为进一步明确转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)抑制Lcn2表达的分子靶点,提供理论依据。**方法:**应用染色体免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)的方法,探寻小鼠脑缺血后Smad3信号蛋白与Lcn2基因的结合位点。**结果:**Smad3信号蛋白与Lcn2基因最可能的结合位点位于Lcn2基因的启动子区chr2:32384637-32385272位置。**结论:**这一结果初步表明了,Smad3信号蛋白与Lcn2的结合关系及结合位点位置,二者的结合共同促进星形胶质细胞肥大、胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达及迁移,明确了神经炎症型星形胶质细胞与LCN2分泌的关系。

关键词:CHIP; 脑缺血; Smad 蛋白; Lcn2基因

DOI: <https://doi.org/10.37155/2661-4766-0305-13>

1 引言

缺血性脑卒中是世界范围内最常见的神经系统疾病之一^[1]。尽管组织再灌注后,血氧支持能迅速恢复,但是处理好随后的炎症级联反应,是防止组织再灌注后继发性损伤的有效途径。星形胶质细胞是大脑内源性炎症调节回路的一部分,反应性星形胶质细胞是许多神经病理事件的标志^[2]。

脂运载体蛋白2(Lipocalin, LCN2)是反应性星形胶质细胞分泌的强效神经毒性因子,在多种疾病中促进了神经元的死亡^[3]。LCN2是一种具有多种功能的急性期蛋白^[4],在炎症、感染或损伤后在中枢神经系统中合成和释放^[5,6]。LCN2可以诱导多种趋化因子参与炎症反应^[7],并可能决定巨噬细胞的表型。在体外,LCN2在脂多糖刺激下由培养的星形胶质细胞分泌,并可作为自分泌介质,激活周围的星形胶质细胞和小胶质细胞^[8]。LCN2可能通过促进星形胶质细胞的促炎激活而加重脑卒中后神经元损伤^[9]。有报道称LCN2也可能通过Rho ROCK(Rho kinase)GFAP通路上调胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidprotein, GFAP),进而在炎症刺激后改变细胞形态^[10]。

TGFβ1在中枢神经系统损伤后迅速上调,是启动反应性星形胶质细胞增生和胶质瘢痕形成的关键调控因子^[11]。TGFβ1通过激活其I型受体激活素受体样激酶5(Actin receptor-like kinase, ALK5),磷酸化其典型的Smad2/3通路,促进星形胶质细胞肥大、GFAP表达、迁移和硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)沉积^[12]。基于以上发现,推断LCN2可能是Smad2/3通路中的相关因子。Smad2和Smad3虽然在氨基酸水平具有92%的同源性,却只有Smad3可直接与DNA序列上的CAGA序列结合,而CAGA盒是一些启动子上的共同序列^[13,14]。现有相关研究并不清楚脑缺血后LCN2的升高是否与Smad3存在关联,如果二者存在结合关系,是否能探知具体的结合位点,针对以上的问题,本研究拟应用ChIP的方法,明确大脑中动脉结扎局灶性脑缺血(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)模型小鼠脑组织Smad3与Lcn2结合的位点,从而明确TGF-β1抑制Lcn2表达的分子靶点。

2 材料和方法

2.1 动物

选取SPF级8-10周龄 C57/BL6雄性小鼠6只,体重25-26g,所有小鼠由徐州医科大学动物中心提供。所有动物实验

*通讯作者:张清秀,1980.3,女,汉族,江苏徐州,南京鼓楼医院,副主任医师,副教授,博士研究生,研究方向:脑卒中。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82071304)。

均通过徐州医科大学伦理委员会的审批。

2.2 主要试剂和仪器

Smad3抗体由abcam公司提供, TaKaRa PCR Thermal Cycler由宝生物工程有限公司提供。QuantStudio 5 Real-Time PCR System 由Thermo Fisher提供。12孔磁力架由生工生物工程有限公司提供。MCAO硅胶线栓由中国广州佳灵生物技术有限公司,型号 1800 / 1900。使用的引物设计软件为Primer 5.0。

2.3 方法

2.3.1 动物分组

选取6只小鼠, 随机分两组, 分别做MCAO模型缺血再灌注24h, 及48h处理。

2.3.2 小鼠脑缺血再灌注模型

小鼠经气体诱导麻醉后进行皮肤消毒、血管分离结扎。分离出右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及颈动脉分叉, 同时分离颈内动脉近颅段。在颈总动脉近心端使用血管夹夹断血流, 使用7-0医用缝合线在颈外动脉远离颈动脉分叉处系死结, 在近颈动脉分叉处系活结。然后使用血管夹夹闭颈内动脉, 至此阻断了来自心脏及大脑Willis环的血流。在颈外动脉外1/3处用显微血管剪斜下剪一个缺口。将硅胶线栓自颈外动脉缺口处插入至颈总动脉夹闭处, 此时松开颈内动脉上的血管夹, 将线栓后退至颈动脉分叉处, 线栓及颈外动脉反转至对侧, 使颈外动脉和颈内动脉处于一条直线上, 线栓顺势插入颈内动脉内, 将之前预留于颈外动脉上的活结拉紧, 以固定线栓防止滑脱。然后松开颈总动脉处的血管夹, 保证来自心脏的血流可灌注除大脑中动脉以外的其他血管, 减少组织损伤。缺血1h后, 用显微血管夹阻断颈总动脉的血流, 松开颈外动脉上的线结, 然后迅速拔出线栓, 再拉紧线结。最后去掉颈总动脉上的血管夹, 保证血流通畅。用4-0医用缝合线缝合皮肤, 医用酒精消毒皮肤, 待小鼠苏醒后转移入饲养箱中。

2.4 MCAO模型纳入及剔除研究的标准

小鼠造模后, 出现以下行为提示造模失败, 将予以剔除: (1) 小鼠清醒状态, 无明显偏瘫症状, 运动正常, 提示未形成缺血梗死病灶。(2) 小鼠出现躁狂、翻滚身体等症状, 提示颅内出血造成颅高压可能。(3) 意识丧失或死亡。

2.5 MCAO后小鼠脑组织细胞分离

使用剪刀将组织剪成小块, 将组织浸泡在PBS中, 然后用匀浆器匀浆。1000rpm, 5min, 4℃离心, 用10mL PBS重悬, 加入270 μL 37%甲醛, 摇床混合10min。加入550 μL 2.5M甘氨酸, 摇床混合5min。1000rpm离心, 弃上清。加入10mL PBS洗涤, 1000rpm, 5min, 4℃离心, -80℃保存。

2.6 ChIP-qPCR

得到的细胞经过交联、裂解、超声破碎后, 得到DNA溶液, 分成3份。1份为25 μL用作输入对照 (Input), 并保存于4℃。1份为250 μL作实验, 做上标记后向实验管中加入555 μL 含蛋白酶抑制剂混合液的稀释缓冲液。加入50 μL 抗小鼠IgG磁珠, 于4℃旋转混合30min。用磁力架于4℃吸附磁珠2min, 转移上清至两个新的Ep管中, 分别为425 μL, 并标记为对应细胞的IP和neg, 同时去掉原磁珠。向标记为IP的实验管中加入5 μg 抗体, 并和 neg 于4℃旋转混合过夜。加50 μL磁珠至 IP和neg反应管中, 于4℃旋转混合1h。用磁力架于4℃吸附磁珠2min。弃掉上清(上清中包括未结合的染色质, 若需要, 也可保存用作后续分析)。分别按顺序用500 μL下列溶液洗涤磁珠。每次于4℃旋转混合5min。完成后, 用磁力架于4℃吸附磁珠2min, 去上清。向各反应管中分别加入500 μL 洗脱混合液。温育、冷却至室温, 将上清转移至新的Ep管中, 再进行纯化。将所有DNA样品分别配置Realtime PCR反应体系, 加样后将PCR反应板置于Realtime PCR仪上进行PCR反应。所有的指标均按以下程序进行: 95℃, 10min; 40个PCR循环 (95℃, 10秒; 60℃, 60秒 (收集荧光))。

为了建立PCR产物的熔解曲线, 扩增反应结束后, 按 (95℃, 10秒; 60℃, 60秒; 95℃, 15秒); 并从60℃缓慢加热到99℃ (仪器自动进行-Ramp Rate为0.05℃/秒)。结果采用2-ΔΔ CT法进行分析。

在*Lcn2*基因启动子区上游2000bp及下游2000bp, 设计四对引物, 引物序列如下。

表1 ChIP 引物序列

Number	Gene position	Primers	Sequence
Gene 1	chr2:32384637-32385272	1-Forward	GGTTCAGGCTTTGGAGAGGA
		1-Reverse	AATGCCACGTTGAGGAGACA

续表:

Number	Gene position	Primers	Sequence
Gene 2	chr2:32385273-32385917	2-Forward	AGCTGAGACTGGGGTGTAAC
		2-Reverse	TGGACAGACAGAACCCATCC
Gene 3	chr2:32385918-32386637	3-Forward	TCCATCTCTACGGCCTCTCT
		3-Reverse	AGATAGGTGGGCTGGAGTTG
Gene 4	chr2:32382637-32384637	4-Forward	AGCAGGACTCGGACTCAAAA

2.7 实时荧光定量PCR

Trizol提取RNA经反转录后得到cDNA，配制好反应体系后，分别加样到96孔反应板，放入PCR仪进行PCR反应。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。*Lcn2*基因引物上游引物5'-GGGAAATATGCACAGGTATCCTC-3'，下游引物5'-CATGGCGAACTGGTTGTAGTC-3'。

3 结果

3.1 *Lcn2*在MCAO后各个时间点的表达情况

有研究表明小鼠发生脑梗死后，*Lcn2*表达逐渐升高，并在23 h达到峰值^[15]。为了找到Smad3与*Lcn2*结合的位点，首先需要明确*Lcn2*在MCAO后各个时间点的表达情况。本研究采用QPCR的方法分别在MCAO后3h、6h、12h、24h、48h、72h、7d，*Lcn2*的表达情况（图1）。脑梗死6h后*Lcn2*开始表达，24h达到峰值，维持到48h，72h开始下降，7d后回落。结合之前的文献报道，确定MCAO模型小鼠*Lcn2*表达的时间点定在24h以及48h。

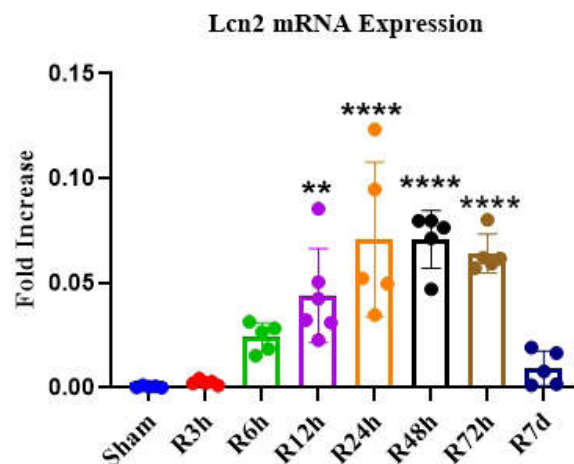


图1 MCAO后3h、6h、12h、24h、48h、72h、7d，*Lcn2*的表达情况。脑梗死6h后*Lcn2*开始表达，24h达到峰值，维持到48h，72h开始下降，7d后回落。

3.2 Gene1的IP值都是最接近30，且24h、48h (IP/Input)%比值大于2

确定时间点后，将小鼠随机分两组，每组3只，分别做脑梗死24h及48h模型鼠，取出脑组织得到细胞，超声波破碎得到DNA。以*Lcn2*基因的启动子区上下游2000bp为模板，设计引物，重点关注上游，具体引物及基因位置见表1。做ChIP实验。如图2所示，无论MCAO 24h或48h，Gene1的IP值都是最接近30。可以看出在Gene1的位置最可能是Smad3与*Lcn2*结合的位点。而这一位置24h、48h (IP/Input)%的值为19.90，比值远远大于2（图2c），符合富集的要求。Gene2的24h、48h (IP/Input)%值最大，富集最大，但是其IP值已经达到40（图2a），并没有结合的意义。相较于Gene1，Gene3、Gene4的IP值均大于30，且24h、48h (IP/Input)%值又小于Gene1（图2a、b）。综上分析，Gene1的位置最可能是Smad3与*Lcn2*结合的位点，这一结合位点位于*Lcn2*基因的启动子区chr2:32384637-32385272位置。

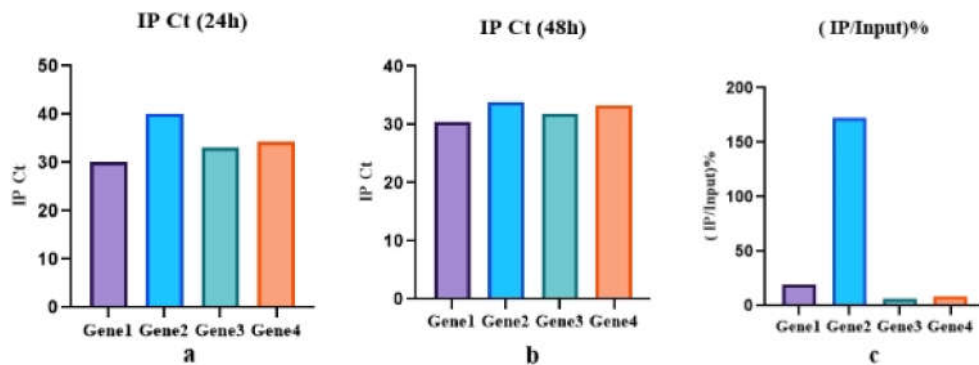


图2 MCAO 24h (a)、48h (b) 四个基因的IP值。无论 MCAO 24h或48h，Gene1的IP值都是最接近30，且 (IP/ Input) %值大于2。

4 讨论与结论

脑卒中后即使有再灌注，但是无可避免的炎症随之而来，在炎症条件下，星形胶质细胞分泌LCN2^[2]。星形胶质细胞是LCN2的来源，也是LCN2的靶点^[16]。

中枢神经受损后，引起TGFβ1的上调，从而激活其受体ALK5，磷酸化典型的Smad2/ 3通路，促进星形胶质细胞GFAP表达，在这一通路中LCN2也能够上调GFAP表达^[10-12, 17]。但是LCN2在这一通路中的具体机制，尚不明了。本研究应用染色体免疫共沉淀 (ChIP) 的方法，明确MCAO模型小鼠脑组织Smad3蛋白与Lcn2基因的结合位点，结果表明二者最可能的结合位点位于Lcn2基因的启动子区chr2:32384637-32385272位置。

但是这一结合的具体过程并不明了，是否Lcn2的结合促进了Smad3蛋白的磷酸化，还是Smad3蛋白的磷酸化促进了Lcn2的结合，尚不明确。但是，以上结果可以推断，二者的结合促进星形胶质细胞肥大、GFAP表达及迁移。这一结果初步明确了反应性星形胶质细胞与LCN2分泌的关系，为进一步研究星形胶质细胞介导的神经炎症反应提供重要依据和视角。Smad3蛋白与Lcn2基因结合具体分子机制，以及Lcn2基因在Smad2/ 3通路中的具体作用，都是本课题要继续深入研究的内容。

LCN2是一种由反应性星形胶质细胞分泌的强效神经毒性因子，是多种疾病状态下神经元死亡的重要原因。LCN2是由反应性星形胶质细胞在神经退行性条件下诱导和分泌的，是神经毒性的有效中介^[3]。LCN2可能通过促进星形胶质细胞的促炎激活而加重脑卒中后神经元损伤^[9]，经典活化通路对急性缺血神经元的促炎作用。如图3所示 LCN2在星形胶质细胞、小胶质细胞、神经元上都有受体。LCN2对海马神经元具有直接毒性；LCN2通过激活小胶质细胞促进神经炎症和神经毒性；LCN2对神经元的髓鞘产生退行性的病变；LCN2通过VEGFA表达对海马微血管系统产生负面影响^[18]。

综上所述，LCN2在星形胶质细胞、小胶质细胞、神经元以及微血管系统中处于中介地位。本研究已经证实经典信号通路中，Smad3蛋白与Lcn2基因存在结合关系，如果通过经典信号通路Smad2/3信号轴抑制LCN2蛋白的表达，继而抑制反应型星形胶质细胞，减少星形胶质细胞与神经元的对话，就能够减少在大脑缺血后的炎症损伤。也为进一步研究靶向星形胶质细胞表型极化的脑梗死治疗药物提供新的思路。

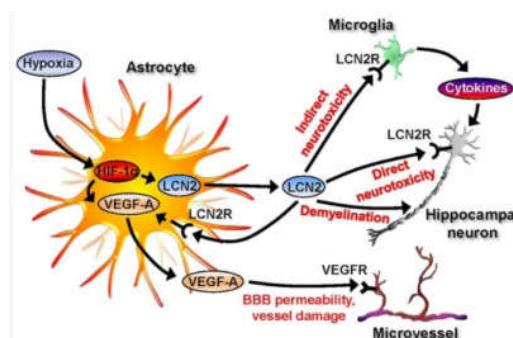


图3 LCN2在星形胶质细胞、小胶质细胞、神经元以及微血管系统中处于中介地位。LCN2对海马神经元具有直接毒

性; LCN2通过激活小胶质细胞促进神经炎症和神经毒性; LCN2通过VEGFA表达对海马微血管系统产生负面影响^[18]。

参考文献:

- [1]Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, Ghosh MK. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24:435-50.
- [2]Ranjbar Taklimie F, Gasterich N, Scheld M, Weiskirchen R, Beyer C, Clarner T, et al. Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6).
- [3]Bi F, Huang C, Tong J, Qiu G, Huang B, Wu Q, et al. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10):4069-74.
- [4]Jha MK, Lee S, Park DH, Kook H, Park KG, Lee IK, et al. Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 49:135-56.
- [5]Xing C, Wang X, Cheng C, Montaner J, Mandeville E, Leung W, et al. Neuronal production of lipocalin-2 as a help-me signal for glial activation[J]. *Stroke*, 2014, 45(7):2085-92.
- [6]Suk K. Lipocalin-2 as a therapeutic target for brain injury: An astrocentric perspective[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144:158-72.
- [7]Kang SS, Ren Y, Liu CC, Kurti A, Baker KE, Bu G, et al. Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions[J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(2):344-50.
- [8]Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(18):6391-410.
- [9]Zhao N, Xu X, Jiang Y, Gao J, Wang F, Xu X, et al. Lipocalin-2 may produce damaging effect after cerebral ischemia by inducing astrocytes classical activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):168.
- [10]Lee S, Park JY, Lee WH, Kim H, Park HC, Mori K, et al. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrogliosis[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(1):234-49.
- [11]Yu Z, Yu P, Chen H, Geller HM. Targeted inhibition of KCa3.1 attenuates TGF-beta-induced reactive astrogliosis through the Smad2/3 signaling pathway[J]. *J Neurochem*, 2014, 130(1):41-9.
- [12]Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, et al. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(17):5843-54.
- [13]ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(5):265-73.
- [14]Wang C, Chen L, Wang L, Wu J. Crystal structure of the MH2 domain of Drosophila[J]. *Mad. Sci China C Life Sci*, 2009, 52(6):539-44.
- [15]Wang G, Weng YC, Han X, Whaley JD, McCrae KR, Chou WH. Lipocalin-2 released in response to cerebral ischaemia mediates reperfusion injury in mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(7):1637-45.
- [16]Egashira Y, Hua Y, Keep RF, Iwama T, Xi G. Lipocalin 2 and Blood-Brain Barrier Disruption in White Matter after Experimental Subarachnoid Hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2016, 121:131-4.
- [17]Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar[J]. *Exp Neurol*, 2014, 253:197-207.
- [18]Kim JH, Ko PW, Lee HW, Jeong JY, Lee MG, Kim JH, et al. Astrocyte-derived lipocalin-2 mediates hippocampal damage and cognitive deficits in experimental models of vascular dementia[J]. *Glia*, 2017, 65(9):1471-90.