

跨膜蛋白受体在 LRRC19 调节机体先天免疫应答反应中的作用

柴立民, 车永哲, 杨荣存

[摘要] 目的 确定已初步鉴定的富亮氨酸重复结构(LRR)蛋白家族成员LRRC19在脾细胞中的表达及定位,并对其功能进行初步研究。方法 通过生物信息学技术预测LRRC19蛋白结构; mRNA原位杂交和RT-PCR检测LRRC19 mRNA在小鼠脾组织以及不同脾细胞中的表达;以不同细菌刺激LRRC19转染的293T细胞,通过分泌性碱性磷酸酶(SEAP)检测技术观察细胞分泌的NF- κ B活性的改变。结果 LRRC19是一种跨膜蛋白,属于LRR蛋白家族成员,胞外区存在串联排列的4个LRR基序,有单一的跨膜结构域,胞内区有2个酪蛋白激酶2(CK2)磷酸化位点; mRNA原位杂交和RT-PCR结果显示,LRRC19 mRNA在脾脏主要表达于B1淋巴细胞;体外实验证实,多种细菌均可使转染LRRC19的细胞NF- κ B活性增强。结论 LRRC19可能是一种跨膜受体,可识别不同的病原体保守分子,可能参与介导细胞信号转导,激活NF- κ B信号途径,启动靶基因转录,调节先天免疫应答过程。

[关键词] LRRC19蛋白,人; B淋巴细胞; NF- κ B

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2010)01-0036-04

LRRC19, as a transmembrane protein receptor, modulates innate immune response

CHAI Li min, CHE Rong-zhe, YANG Rong-cun*. Department of Immunology, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

* Corresponding author, E-mail: ryang@nankai.edu.cn

[Abstract] **Objective** To study an identified leucine rich repeats (LRRs) protein, LRR containing 19 (LRRC19), and to determine the distribution, localization, and biological function of LRRC19 mRNA expression in spleen cells. **Methods** Bioinformatics analysis was used to predetermine the structure of LRRC19 gene and protein. The distribution and localization of LRRC19 mRNA expression were detected by hybridization *in situ* with LRRC19 mRNA specific probes and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Additionally, the activity of secreted alkaline phosphatase (SEAP) was detected for analyzing the nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation in HEK293T cells transfected with the expression vector of LRRC19 *in vitro*. **Results** LRRC19 was found to be a transmembrane protein, with 4 LRR motifs, a single transmembrane domain and two phosphorylation sites of casein kinase 2 (CK2) at cytoplasmic domain, as analyzed through bioinformatics soft wares. Previous study revealed that LRRC19 without cytoplasmic Toll/IL-1 receptor (TIR) domain could activate NF- κ B to enhance the expression of proinflammatory cytokines. LRRC 19 could also be demonstrated by ectopic expression in RAW 264 7 cells after transfection with murine LRRC19 expression plasmid pcDNA3.1 F V5 LRRC19 indicating that it was a transmembrane protein. In present study, the results of hybridization *in situ* and RT-PCR showed that LRRC19 mRNA was expressed in the germinal center and splenic cord of mouse spleen. Additionally, LRRC19 was predominantly expressed in CD5⁺ lymphocyte, known as B1 cell. *In vitro* study also indicated that several pathogens might significantly enhance the NF- κ B activity of the cells transfected with LRRC19. **Conclusion** LRRC19 might be a transmembrane receptor, and it may be able to recognize the conserved sequence of pathogens, participate in the induction of cell signaling, activate the NF- κ B signal pathway, promote transcription of target genes, and modulate the innate immune response.

[Key words] LRRC19 protein, human; B lymphocytes; NF kappa B

富亮氨酸重复结构(leucine rich repeats, LRRs)是介导蛋白与蛋白间相互作用的高度保守的氨基酸序列。晶体结构分析显示,每一个独立的亮氨酸重复构成一个独立的 $\beta\alpha$ 单位,由一个短的 β 折叠和一个 α 螺旋组成,两者近乎平行排列。另外,每个连续重复的

α 螺旋围绕一个共同的轴,彼此也近乎平行排列,构成一个弯曲的马蹄形结构的外层, β 折叠围绕此轴平行排列。由于LRR基序具有这种马蹄形的结构特征,故容易与较小的球形蛋白结合,介导蛋白与蛋白间的相互作用。LRR蛋白家族成员广泛存在于细菌、真菌、植物和动物等诸多物种的不同组织中,参与机体中多种生物学作用。本研究通过生物信息学分析鉴定了一个LRR蛋白家族成员——LRRC19,通过mRNA原位杂交技术观察其在小鼠脾脏细胞中的表达及定位,并对其功能进行了初步研究。

[基金项目] 国家自然科学基金(30771967, 30872315); 国家科技部基金(06C26211200695, 2008AA02Z129); 国家高技术研究发展计划(863计划, 2006AA020502); 天津市科委基金(07JCZDJC03300, 06ZHCXSH04800)

[作者简介] 柴立民, 医学博士, 助理研究员, 南开大学医学院在站博士后。主要从事免疫抑制细胞新功能基因方面的研究。E-mail: liminchai@hotmail.com

[作者单位] 300071 天津 南开大学医学院分子免疫学实验室(柴立民、杨荣存), 解剖学教研室(车永哲)

[通讯作者] 杨荣存, 电话: 022-23509007; E-mail: ryang@nankai.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料 近交系C57BL/6雄性小鼠, 6~8周龄, 购自军事医学科学院动物中心。HEK293T细胞株

为本实验室冻存, 高温高压灭活细菌混悬液购自天津疾病预防控制中心, pcDNA3 1-V5-LRRC19、pcDNA3 1-V5-LRRC19 Δ (LRRC19 胞内区序列) 由本实验室构建并保存。分泌型碱性磷酸酶 (secreted alkaline phosphatase, SEAP) 化学发光检测试剂盒、pSEAP-NF- κ B 报告质粒购自 Clontech 公司, LRRC19 mRNA 多点标记 DIG 探针原位杂交试剂盒购自天津灏洋生物公司。anti-CD5-PE 抗体、anti-CD19-FITC 抗体购自 Santa Cruz 公司, Trizol、脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学预测

通过 HMM-pfam 软件预测 LRRC19 基因的组织分布, LRRC19 蛋白跨膜区利用 TMHMM (version 2.1) 和 HMMTOP (version 2.1) 软件共同分析, 该蛋白结构域通过 Motif scan 在线软件分析确定。

1.2.2 小鼠脾脏分离、固定及脾细胞分选

无菌条件下取出 C57BL/6 小鼠脾脏, 迅速放入 4% 多聚甲醛, 室温固定 24h 后, 常规脱水、包埋, 以备进行 mRNA 原位杂交。另取 3 只小鼠脾脏, 研磨制备脾细胞悬液, 用淋巴细胞分离液离心获得单核细胞, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 血清封闭 30min, 加入 anti-CD19-FITC、anti-CD5-PE 抗体混合液, 室温孵育 30min, 0.1 mol/L PBS 漂洗 1 次, FACS Aria 流式细胞分选仪 (BD 公司) 分选 CD5⁺CD19⁻、CD5⁻CD19⁺ 和 CD5⁻CD19⁻ 细胞群。将分选出的细胞分为两组, 一组细胞直接用 4% 多聚甲醛固定, 以备 mRNA 原位杂交实验, 另一组细胞加入 RNA 提取液 Trizol, 以备提取总 RNA。所用试剂均经过焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理, 以防止 RNA 在操作过程中降解。

1.2.3 RT-PCR 分析

Trizol 一步法提取脾细胞总 RNA, 经反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用小鼠 LRRC19 特异性引物进行 PCR 扩增。扩增条件: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35 个循环; 72℃ 后延伸 5min。以小鼠 GAPDH 作为内参。LRRC19 引物序列: 正义 5'-ATGAAAGT-CACACGCTTCATGTTTTGGG-3', 反义 5'-CTTTGTTCATGTACCTCATGATATCT-3'; GAPDH 引物序列: 正义 5'-GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3', 反义 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, UV 凝胶成像系统分析处理。

1.2.4 mRNA 原位杂交

以小鼠 LRRC19 mRNA (GenBank NM_175305) 序列为模板, 设计地高辛多点标记的 LRRC19 mRNA 特异性探针, 序列如下。探针 1: 5'-AGCTGTGGTGCATCGAAGAGCCGTATC-3'; 探针 2: 5'-TCATAGCAATGAAATAAGCACTGAAGTT-3';

探针 3: 5'-CAGGCGATGGTGGTTGTAACCTCAGCA-G-3'。3 种探针混合使用。切取 5 μ m 脾组织石蜡切片, 按标准操作脱蜡至水, 梯度乙醇复水, 0.01 mol/L PBS 冲洗 2 次; 分选后的细胞直接涂布于多聚赖氨酸处理的载玻片上。mRNA 原位杂交严格按照试剂盒说明操作。杂交结束后, 二氨基联苯胺 (DAB) 染色, 光学显微镜下观察, 至细胞质阳性染色与细胞外背景染色对比度反差明显时用蒸馏水冲洗终止反应。细胞质呈现棕黄色颗粒为阳性反应。染色完成后, 苏木素复染, 胞核为蓝色。梯度乙醇脱水, 中性树胶封固, 光学显微镜下成像并分析实验结果。

1.2.5 SEAP 检测 NF- κ B 活性

用 DMEM 高糖培养基常规培养 HEK293T 细胞, 制备单细胞悬液, 调整细胞数为 2×10^6 /ml 后接种至 24 孔板 (500 μ l/孔), 每组设 3 个复孔。待细胞贴壁后, 用 pcDNA3 1-V5-LRRC19 或 pcDNA3 1-V5-LRRC19 Δ 与 pSEAP-NF- κ B 通过 Lipofectamine 共转染细胞, 以 pcDNA3 1 质粒表达载体作为阴性对照。转染 24h 后, 吸取细胞上清液 100 μ l, 4℃ 保存; 同时, 补充细胞培养基至 500 μ l, 加入稀释后的灭活大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、痢疾志贺菌 (*Shigella dysenteriae*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 和变形杆菌 (*Bacillus proteus*) 混悬液, 刺激细胞 24h 后, 吸取细胞上清液。按照 SEAP 试剂盒说明操作, 检测细胞上清液的中 NF- κ B 活性, 通过化学发光免疫分析仪检测各样本的相对荧光强度 (RFU)。

2 结 果

2.1 LRRC19 基因与蛋白结构分析

生物信息学分析显示, LRRC19 基因位于人类 9 号染色体 p21.1 区 (图 1A), 由 5 个外显子组成开放阅读框。蛋白结构预测结果证实, LRRC19 是作为跨膜蛋白存在的, 由 370 个氨基酸构成, 胞外区拥有 4 个串联排列的 LRR 基序, 在起始氨基端由 24 个氨基酸组成可剪切的信号肽, 单一的跨膜结构域位于 A271-I291 (图 1B)。成熟的 LRRC19 蛋白由 346 个氨基酸组成, 分子量为 42.33 kD。进一步分析发现, 在 LRRC19 蛋白胞内区存在 2 个潜在的酪蛋白激酶 2 (casein kinase 2, CK2) 磷酸化位点。

2.2 LRRC19 mRNA 在小鼠脾脏中的分布及细胞定位

mRNA 原位杂交结果显示, LRRC19 mRNA 广泛分布于小鼠脾脏的各个部位, 在脾索和生发中心均有大量的阳性细胞存在 (图 2)。经流式细胞仪分选获得 CD5⁺CD19⁻、CD5⁻CD19⁺ 和 CD5⁻CD19⁻ 细胞群。RT-PCR 检测显示, LRRC19 mRNA 主要在 CD5⁺CD19⁻ 细胞表达, 在 CD5⁻CD19⁺ 和 CD5⁻CD19⁻ 细胞的 RT-PCR 产物中未发现目的条带 (图 3A)。mRNA 原位杂交结果显示, CD5⁺CD19⁻ 细胞胞质中均呈现棕黄色, 进一步证实了 LRRC19 mRNA 在该类细胞的表

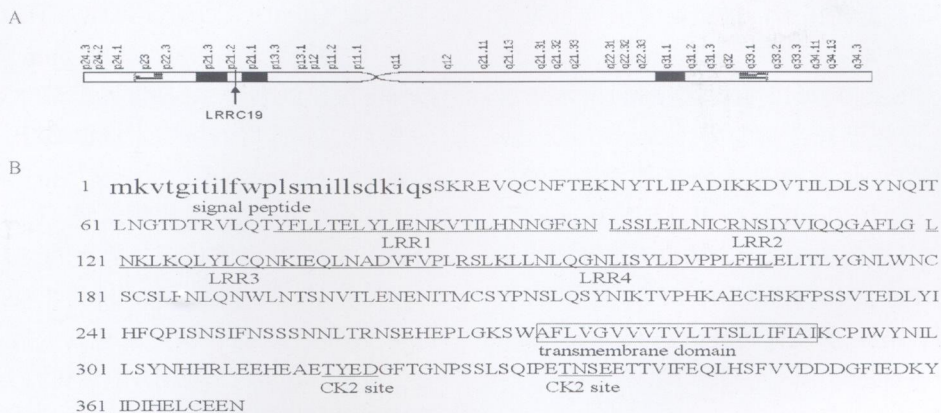


图 1 LRRC19 基因定位和蛋白结构分析
A. LRRC19 基因的染色体定位; B. LRRC19 蛋白序列和结构分析

Fig. 1 Gene location and protein structure of LRRC19

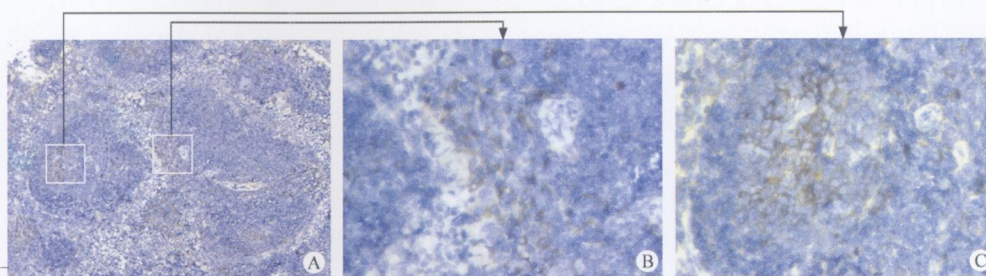


图 2 LRRC19 mRNA 在小鼠脾脏组织中的分布
A. 脾脏组织(×100); B. 脾索(×400); C. 生发中心(×400); 胞质呈现棕黄色为阳性细胞

Fig. 2 Distribution and localization of LRRC19 mRNA in mouse spleen

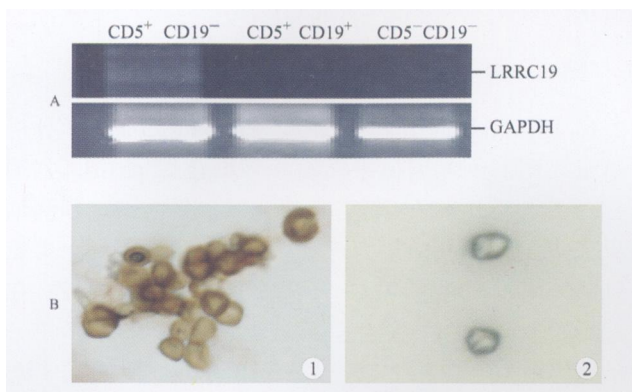


图 3 LRRC mRNA 在不同脾细胞中的表达

A. RT-PCR 检测 LRRC19 mRNA 在 CD5⁺ CD19⁻、CD5⁻ CD19⁺ 和 CD5⁻ CD19⁻ 淋巴细胞中的表达情况; B mRNA 原位杂交分析 LRRC19 mRNA 在 CD5⁺ CD19⁻ 和 CD5⁻ CD19⁺ 细胞中的表达。1 CD5⁺ CD19⁻ 淋巴细胞(×1 000); 2 CD5⁻ CD19⁺ 淋巴细胞(×1 000)

Fig 3 Expression of LRRC19 mRNA in different kinds of spleen cells

达,而在 CD5⁻ CD19⁺ 细胞中未发现阳性反应(图 3B)。

2.3 灭活菌株对转染 LRRC19 的 293T 细胞中 NF-κB 活性的影响 不同灭活菌株均可使转染 pcDNA-V5-LRRC19 的 293T 细胞的 NF-κB 活性显著增强,而转染 pcDNA3.1-V5-LRRC19 Δ 和 pcDNA3.1 质粒表达载体

的细胞经诱导后 NF-κB 活性无明显改变(图 4)。

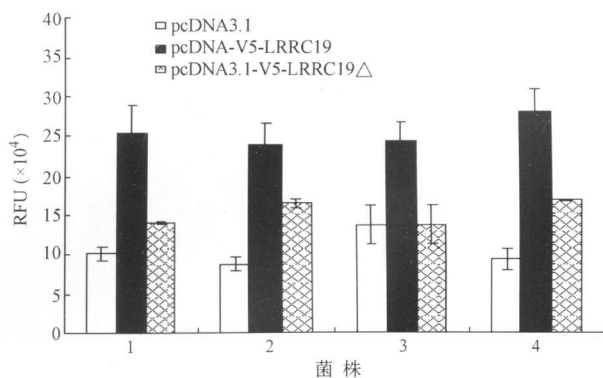


图 4 不同灭活菌株对转染各质粒的 293T 细胞分泌的 NF-κB 活性的影响

1. 大肠埃希菌; 2. 痢疾志贺菌; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 变形杆菌

Fig 4 Effects of 293T cells, transfected with ectopic LRRC19 induced by deactivated strains of bacteria, on NF-κB activity

3 讨 论

LRR 是一个高度保守的氨基酸序列,通常由 20~29 个氨基酸残基组成,其中 11 个氨基酸高度保守。蛋白晶体结构分析显示,LRR 是由一个 β 片层和一个 α 螺旋通过 loop 环连接形成的马蹄形分子结构域^[1]。对

LRR 进行的功能研究发现,不论位于胞外、胞内还是细胞膜上,许多 LRR 蛋白家族成员均参与机体的固有性免疫应答反应^[2]。

LRRC19 是我们通过生物信息学技术鉴定的一个新的 LRR 蛋白家族成员,属于一种跨膜蛋白,其胞外区拥有 4 个串联排列的 LRR 基序,前期序列对比及进化树研究证实,LRRC19 胞外区序列与 Toll 蛋白样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 胞外区序列相类似,且蛋白质结构具有较强的同源性。TLRs 是存在于生物体内的一类重要的模式识别受体,在机体天然免疫反应中起着重要作用。TLRs 主要识别病原体保守的结构分子 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs),介导细胞内信号传导,最终导致核转录因子 NF- κ B 活化,从而启动靶基因表达,介导机体的炎症应答^[3]。TLRs 胞外区含有相似的 LRRs 基序,胞内区存在与 Toll 及 IL-1 同源的 TIR 结构域 (Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR)。不同于 TLRs 的是,LRRC19 在胞内区没有 TIR 结构域,但存在 2 个 CK2 磷酸化位点。CK2 是真核生物体内高度保守的丝/苏氨酸四聚体激酶,它可以通过 Ser536 和 Ser276 位点 p65 的磷酸化介导信号传递,激活 NF- κ B 信号通路^[4]。笔者前期研究结果显示,LRRC19 在 RAW264.7 细胞中的表达主要集中于细胞膜周围,提示其为一种跨膜蛋白,与生物信息学分析结果一致;异位表达的 LRRC19 在不同的 TLRs 配体刺激下,可使细胞内 NF- κ B 活性显著增强,炎症因子 IL-8 表达量明显升高^[5]。由此笔者认为,LRRC19 是一个跨膜蛋白受体,可能通过有别于 TLRs 的信号传导通路,在 CK2 磷酸化的协同作用下激活转录因子 NF- κ B,启动机体的免疫应答。

mRNA 原位杂交结果显示,LRRC19 mRNA 在小鼠脾脏中的表达主要集中于生发中心和脾索区域。进一步研究证实,CD5⁺CD19⁻脾脏细胞表达 LRRC19,而在其他两种细胞 (CD5⁻CD19⁺ 和 CD5⁻CD19⁻) 中未检测到 LRRC19 mRNA 的存在。35% 的脾细胞属于 B 淋巴细胞 (B 细胞),在脾脏中 B 细胞主要集中在生发中心和骨髓的淋巴滤泡。CD5 是 B1 细胞的特异性表面抗原。根据实验结果,笔者认为 LRRC19 在脾脏主要

表达于 B1 细胞。B1 细胞属于 T 细胞非依赖性细胞,可以识别多种病原体,调节先天免疫应答反应^[6]。LRRC19 具有与 TLRs 相似的胞外区 LRR 结构域和胞内区潜在的 CK2 磷酸化位点,可以被多种不同的 TLRs 识别,激活 NF- κ B 信号通路,刺激脾脏的 B1 细胞表达 IL-8,故笔者认为 LRRC19 可能参与机体的先天免疫防御反应。为了验证这一点,笔者在体外用多种灭活的细菌刺激转染 pcDNA3.1-V5-LRRC19 的 293T 细胞,结果显示,不同细菌刺激后,转染 pcDNA3.1-V5-LRRC19 的细胞 NF- κ B 活性显著增强。由此证实,LRRC19 可以识别多种病原体分子,激活 NF- κ B 信号通路,启动机体的免疫应答。

综上所述,LRRC19 可能是一个新的 LRR 蛋白家族成员,是一种跨膜受体,主要在脾脏中的 B1 淋巴细胞中表达,通过识别不同的 PAMPs,介导细胞信号传导,激活 NF- κ B 信号途径,启动靶基因表达,调节先天免疫反应。本研究仅对 LRRC19 的组织定位和功能做了初步探讨,其在细胞内如何激活 NF- κ B 信号传导途径及其功能的作用机制,还有待进一步深入研究证实。

【参考文献】

- [1] Kobe B, Kajava AV. The leucine rich repeat as a protein recognition motif[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6): 725-732.
- [2] Kobe B, Kajava AV. The leucine rich repeat as a protein recognition motif[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6): 725-732.
- [3] Akira S. Toll-like receptor signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38105-38108.
- [4] Shaul JD, Farina A, Huxford T. The human IKK β subunit kinase domain displays CK2-like phosphorylation specificity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(3): 592-597.
- [5] Chai L, Dai L, Che Y, et al. LRRC19, a novel member of the leucine rich repeat protein family, activates NF- κ B and induces expression of proinflammatory cytokines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3): 543-548.
- [6] Andersson P, Ridderstad A, McGuire J, et al. A constitutively active aryl hydrocarbon receptor causes loss of peritoneal B1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(2): 336-341.

(2009-09-28 收稿 2009-11-02 修回)

(责任编辑 张金桐)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

统计学处理部分应写明所用统计分析方法的具体名称(如成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析);当涉及总体参数时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。对于服从偏态分布的定量资料,应采用 $M(Q)$ 方式表达,不应采用 $\bar{x} \pm s$ 方式表达。对于定量资料和定性资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,前者不应盲目套用 t 检验和方差分析,后者不应盲目套用 χ^2 检验。使用相对数时,分母不宜小于 20;要注意区分百分率与百分比。统计学符号按 GB 3358-82《统计学符号及名词》的有关规定书写,一律用斜体。