·论著·

神经营养因子neuritin在人体组织中的表达及验证

孟平平[1],朱井玲[1],曹建[1],魏瑜[2],罗星[1]
(石河子大学 1.医学院医学遗传学教研室;2.第一附属医院检验科,新疆 石河子 832002)

摘要 目的 基于生物信息学探讨神经营养因子neuritin(NRN1)在人体组织中的表达并验证。**方法** 利用人类蛋白图谱(HPA)数据库对*NRN1*基因进行组织表达谱分析;分别利用实时定量PCR和免疫组织化学检测*NRN1* mRNA及蛋白表达。利用已构建的pEGFP-C1-neuritin绿荧光蛋白融合表达载体转染人肾上皮细胞系293细胞,免疫荧光检测293细胞中NRN1蛋白定位情况;同时检测小鼠海马神经元细胞系HT22细胞中内源性NRN1蛋白定位情况。**结果** HPA数据库分析结果显示,*NRN1*主要在大脑皮层、甲状旁腺、脂肪组织、胎盘等组织中表达。验证结果显示,NRN1在上述组织中均有表达,其中,脑及脾脏组织中表达量最高。免疫荧光结果显示NRN1在HT22细胞主要定位在细胞膜上;在293细胞主要定位在细胞质中。**结论** NRN1在人体脑、心脏、肝脏、肺、小肠以及卵巢等多种组织中表达,在脑组织中呈高表达。NRN1主要定位在细胞膜及细胞质中。

关键词 neuritin;组织分布;表达谱;免疫组织化学;亚细胞定位
中图分类号 R741.02 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)06-0505-05
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250606.1519.024
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.06.005

Expression and validation of the neurotrophin neuritin in human tissues

MENG Pingping[1], ZHU Jingling[1], CAO Jian[1], WEI Yu[2], LUO Xing[1]
(1. Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832002, China)

Abstract Objective To examine the expression and validate the localization of the neurotrophin neuritin (NRN1) in human tissues using bioinformatics and experimental methods. **Methods** The tissue-specific expression of NRN1 was analyzed using the Human Protein Atlas (HPA) database. *NRN1* mRNA and protein expression were experimentally validated using real-time quantitative PCR and immunohistochemistry, respectively. A pEGFP-C1-NRN1 green fluorescent protein fusion vector was transfected into 293 cells, and NRN1 localization was assessed using immunofluorescence. Endogenous NRN1 localization was also examined in hippocampal HT22 cells. **Results** According to the HPA database, *NRN1* expression was enriched in the cerebral cortex, parathyroid gland, adipose tissue, and placenta. Experimental validation confirmed NRN1 expression in all the aforementioned tissues, with highest levels observed in the brain and spleen. Immunofluorescence analysis revealed that NRN1 was predominantly localized to the membrane in HT22 cells and to the cytoplasm in 293 cells. **Conclusion** NRN1 is expressed in various human tissues, with notably high expression in the brain. It is primarily localized to the cell membrane and cytoplasm.

Keywords neuritin; tissue distribution; expression profile; immunohistochemistry; subcellular localization

神经营养因子neuritin(NRN1,CPG15)与神经可塑性密切相关[1],由N端27个氨基酸信号肽、中间具有活性的截短体片段以及C端磷脂酰肌醇锚定位点GPI构成[2]。NRN1在中枢神经系统发育中高表达,可促进轴突和树突生长、神经元迁移和突触成熟、抑制神经元凋亡及维持神经元存活[3-7]。中枢神经系统发育成熟后,NRN1表达水平与神经损伤后的神经再生和修复、学习记忆密切相关[8-10]。此外,NRN1在促进血管生成方面也发挥着保护作用[11]。本课题组前期研究表明,NRN1重组蛋白可促进损伤坐骨神经的功能修复、神经纤维和髓鞘的再生和有序排列[12];促进急性脊髓损伤后神经运动功能的恢复及减少神经细胞凋亡[13-14]。这些研究预示着NRN1有望成为治疗神经损伤及神经退行性疾病的新靶点。

然而,NRN1在人体其他组织的表达情况还未见系统的研究。近年来研究[15-16]显示NRN1还可能

基金项目: 国家自然科学基金(32060164)
作者简介: 孟平平(1990-),女,讲师,硕士研究生.
通信作者: 罗星,E-mail:447327473@qq.com
收稿日期: 2024-07-30
网络出版时间: 2025-06-09 11:44:14

涉及肿瘤等其他疾病。本研究基于生物信息学探讨NRN1在人体组织中的表达并进行验证，旨在为深入研究其功能及分子机制提供依据。

1　材料与方法

1.1　细胞来源与主要试剂

人肾上皮细胞系293细胞和小鼠海马神经元细胞系HT22细胞购自中国科学院典型培养物保管委员会细胞库。主要试剂包括Multiple Tissue cDNA panel试剂盒（日本TaKaRa公司），DMEM培养基（美国Gibco公司），胎牛血清（以色列Biological Industries公司），转染试剂lipofectamin™2000、实时荧光定量试剂盒（美国Invitrogen公司），NRN1抗体（英国abcam公司），EnVision™+HRP（丹麦DAKO公司）。

1.2　方法

1.2.1　*NRN1*基因的组织表达谱分析：在人类蛋白图谱（Human Protein Atlas，HPA）数据库（https://www.proteinatlas.org/）搜索栏输入“NRN1”，然后选择“TISSUE”模块来分析*NRN1*基因的组织表达谱。

1.2.2　实时定量PCR检测：利用Multiple Tissue cDNA panel试剂盒提供的16种人体组织/细胞cDNA，通过实时定量PCR检测脾脏、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠、外周血白细胞、心脏、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰腺中*NRN1* mRNA的表达。*NRN1*全长序列（426 bp）特异性引物为：正向5’-ATGGGACTTAAGTTGAACGGC -3’；反向5’-TCAGAAGGAAAGCCAGGTCGC -3’。*G3PDH*，正向5’- TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT -3’；反向5’- CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC -3’。PCR反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，64 ℃退火30 s，72 ℃延伸50 s，以此条件共39个循环；最后72 ℃延伸5 min。

1.2.3　免疫组织化学检测：依据HPA数据库分析结果，收集石河子大学医学院病理科尸检获得的6例人体正常组织。取石蜡包埋的人体各组织切片（厚4 μm），25 ℃水面展开后多聚赖氨酸60 ℃包被过夜。切片用二甲苯脱蜡后乙醇分级（100%、95%、90%、80%和70%）水化。3%过氧化氢浸泡10 min以阻断内源性过氧化物酶活性，牛血清白蛋白孵育封闭非特异抗原，切片用特异NRN1抗体（1 ∶ 200）孵育4 ℃过夜，然后与EnVision™+HRP室温孵育30 min。切片用苏木精复染1 min，脱水，封片。细胞核经苏木精复染呈蓝紫色，细胞棕黄色为NRN1表达阳性。本研究获得石河子大学伦理委员会批准。

1.2.4　免疫荧光分析：293细胞NRN1低表达。转染带有荧光的pEGFP-C1-NRN1质粒至细胞，采用直接免疫荧光检测NRN1细胞定位。将293细胞（2×10^5/孔）接种于含爬片的6孔板中，37 ℃、5% CO_2培养18~24 h至密度70%~80%。使用Lipofectamine™ 2000将4 μg已测序验证的pEGFP-NRN1质粒转染至细胞，转染24 h后在激光共聚焦显微镜下观察。

HT22细胞NRN1高表达，采用间接免疫荧光检测NRN1细胞定位。将HT22细胞（2×10^5/孔）接种于含爬片的6孔板中，37 ℃、5% CO_2培养18~24 h至密度70%~80%。弃培养基，PBS轻柔清洗2次，4%多聚甲醛（4 ℃）固定30 min，PBS清洗（3 min）3次；随后滴加NRN1一抗（1 ∶ 200），37 ℃孵育2 h，PBS清洗（3 min）3次。避光条件下孵育TRITC标记二抗（1 ∶ 100，37 ℃孵育2 h），PBS清洗（3 min）3次。DAPI染核5 min，PBS清洗后封片。在激光共聚焦显微镜下观察。

2　结果

2.1　HPA数据库分析结果

结果显示，*NRN1*在大脑皮层、甲状旁腺、脂肪组织、胎盘等组织中表达。见图1。

2.2　实时定量PCR检测结果

研究[17]显示，*NRN1* mRNA在脑组织中高表达；以此为依据将其他组织和细胞中的表达与脑组织进行比较。结果显示，*NRN1* mRNA在脾、胎盘组织中高表达；*NRN1* mRNA在胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、心脏、肺、肝、骨骼肌、胰腺组织中低表达；*NRN1* mRNA在结肠组织、肾组织和白细胞中不表达，见图2。

2.3　免疫组织化学检测结果

结果显示，NRN1在大脑、小脑、海马、脊髓、心脏、肺、结肠、小肠、肝、胰腺组织都呈阳性表达，与实时定量PCR检测结果一致。见图3。

2.4　免疫荧光检测结果

利用免疫荧光检测了NRN1在293细胞及HT22细胞中的定位情况。结果显示，在293细胞中，NRN1主要集中在细胞质中；在HT22细胞中，内源性NRN1主要集中在细胞膜上。见图4。

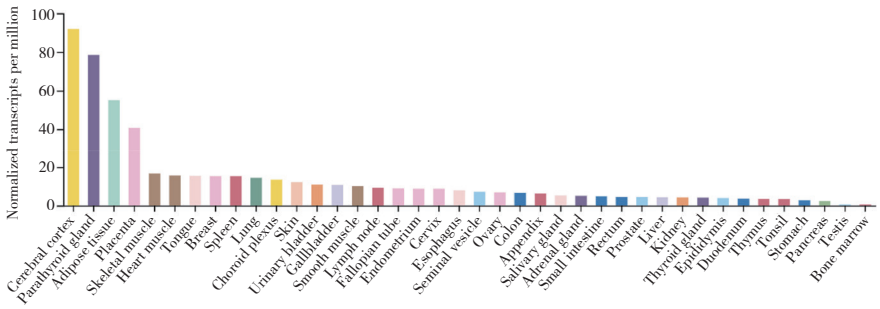
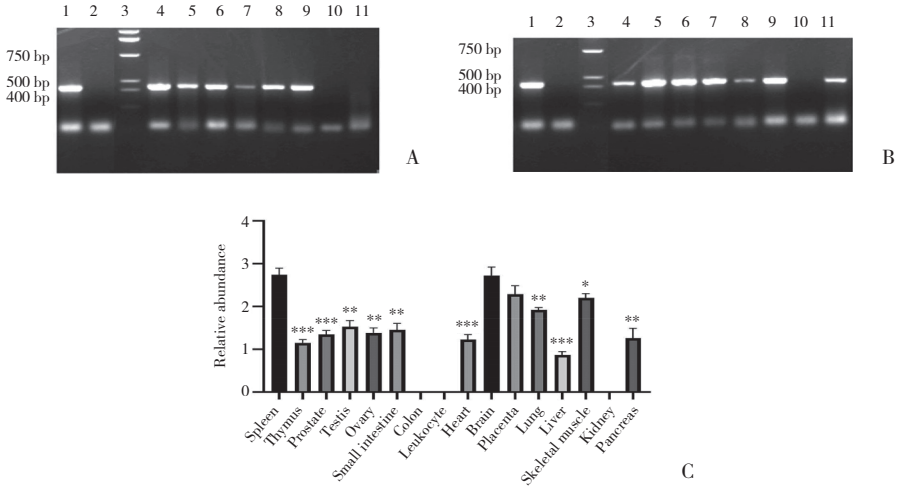


图1　基于HPA数据库的人类各组织中*NRN1*表达

Fig.1　*NRN1* expressions in human tissues in HPA database



A, NRN1 mRNA.1, positive control; 2, negative control; 3, maker; 4, spleen; 5, thymus; 6, prostate; 7, testis; 8, ovary; 9, small intestine; 10, colon; 11, leukocyte. B, *NRN1* mRNA. 1, positive control; 2, negative control; 3, maker; 4, heart; 5, brain; 6, placenta; 7, lung; 8, liver; 9, skeletal muscle; 10, kidney; 11, pancreas. C, the result of grayscale scanning. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. brain.

图2　人体各组织和细胞中*NRN1* mRNA表达

Fig.2　The expression of *NRN1* mRNA in various tissues and cells in human

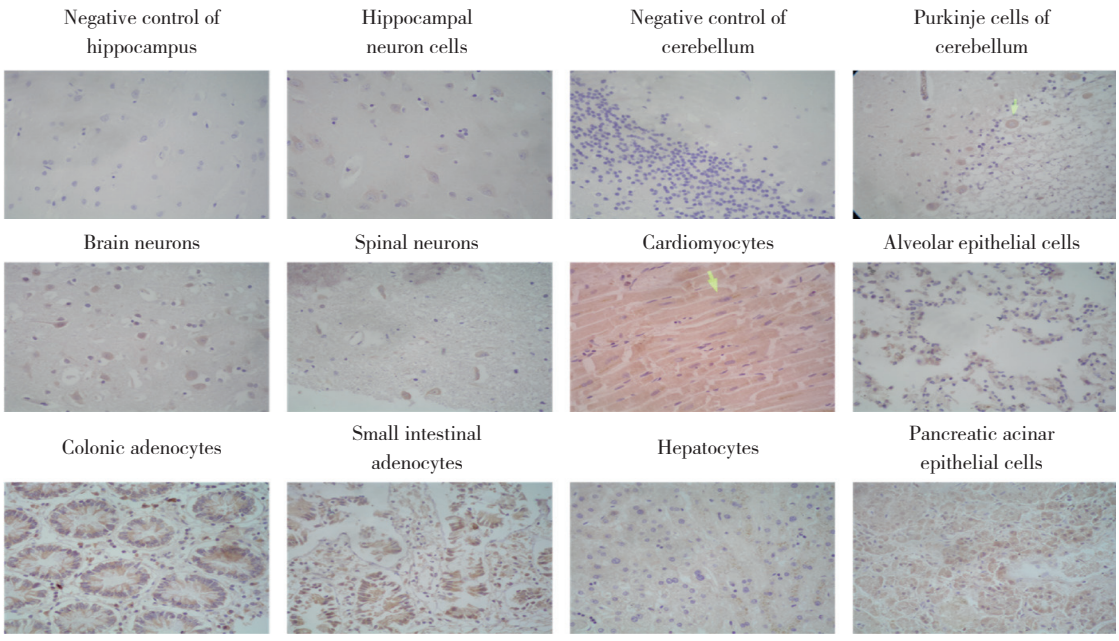


图3　免疫组织化学检测各组织中NRN1蛋白的表达　×400

Fig.3　The expressions of NRN1 protein in various tissues by immunohistochemistry　×400

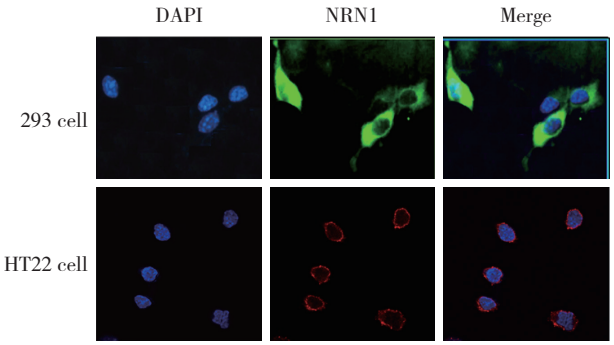


图4　免疫荧光检测293细胞及HT22细胞中NRN1定位情况　×1 000

Fig.4　The localization of NRN1 in 293 and HT22 cells by immunofluorescence　×1 000

3　讨论

NRN1是神经可塑性调控的关键分子，以往研究多集中于神经系统[18]。NRN1在全身组织的表达谱及潜在功能尚未明确。本研究结果显示，NRN1在人体多种组织中广泛表达，其亚细胞定位存在组织特异性差异。本研究为拓展NRN1的生物学功能认知提供了重要依据。

验证结果显示，NRN1除在中枢神经系统高表达外，在肝、肺、心脏、胰腺、小肠外周组织也表达。NRN1在肝组织中表达，提示NRN1有可能参与肝细胞在肝脏发育或再生过程中的增殖和（或）功能成熟，与以往研究[19]结果一致。已有研究[20]报道NRN1在肺气肿和肺癌患者中异常表达。YANG等[11]研究发现NRN1可通过调控DLL4/Notch信号通路抑制肿瘤血管生成，这为开发新型抗肿瘤治疗策略提供了潜在靶点。目前，NRN1在心脏组织中作用的直接证据尚未获得，但其他神经营养因子的研究结果提供了重要参考。例如，神经生长因子（nerve growth factor，NGF）在缺血性心脏病中发挥心脏保护作用[21]；脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）通过TrkB受体激活Ca^{2+}/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ信号级联反应，调节心肌功能[22]。这些发现提示NRN1可能通过类似的神经–心脏交互机制参与心肌保护。在胚胎和胎儿时期胰腺中Trk-A及其配体NGF的表达表明，NGF及其受体可能在胰腺组织的发育中发挥重要作用[23]。已有研究[24]报道，NGF和神经营养因子–3（neurotrophin-3，NT-3）样免疫反应性均存在于肠神经系统中。即NGF和NT-3样免疫反应性均在小肠和大肠神经元中被检测到。由此推测NRN1可能在胰腺和小肠中具有潜在作用。

NRN1是一种分泌型蛋白，有可溶及GPI锚定2种形式[2]。本研究中NRN1亚细胞定位结果表明，HT22细胞中NRN1主要定位于细胞膜，293细胞中主要定位于细胞质，提示NRN1在神经系统中可能通过GPI锚定形式发挥作用，而在神经系统外的组织可能通过可溶形式发挥作用，这有待后续实验进一步论证。

综上所述，人体多种正常组织中NRN1均有不同程度表达。NRN1可能在中枢神经系统以外的其他组织中也发挥重要作用。本研究为深入探讨NRN1的功能及作用机制奠定了基础。本研究不足之处：（1）实时定量PCR检测的组织和细胞类型有限（仅16种），且与免疫组织化学所用样本不完全一致；（2）使用的多克隆抗体可能存在非特异性染色问题。这些因素可能影响结果的准确性，因此需进一步研究论证。

参考文献：

[1] GONZALEZ-FIGUEROA P，ROCO JA，PAPA I，et al. Follicular regulatory T cells produce neuritin to regulate B cells [J]. Cell，2021，184（7）：1775-1789.e19. DOI：10.1016/j.cell.2021.02.027.

[2] 姚金晶，梅岩艾. Neuritin的研究进展 [J]. 生理学报，2013，65（5）：483-488. DOI：CNKI：SUN：SLXU.0.2013-05-002.

[3] WANG HY，ZHANG X，GUI F，et al. In vitro effects of recombinant human neuritin on hair cell recovery post-gentamicin injury in SC lineage-tracing models：involvement of Notch and FGFR signaling [J]. Neurochem Int，2025，183：105935. DOI：10.1016/j.neuint.2025.105935.

[4] ZHANG Z，ZHOU HL，ZHOU JY. Neuritin inhibits astrogliosis to ameliorate diabetic cognitive dysfunction [J]. J Mol Endocrinol，2021，66（4）：259-272. DOI：10.1530/JME-20-0321.

[5] ZHU JL，LI Y，ZHONG C，et al. Neuritin affects the activity of neuralized-like 1 by promoting degradation and weakening its affinity for substrate [J]. Acta Biochim Biophys Sin，2023，55（10）：1650-1658. DOI：10.3724/abbs.2023098.

[6] SONG DD，GUI F，LI GX，et al. Neuritin improves cognitive impairments in APP/PS1 Alzheimer's disease mice model by mitigating neuronal ferroptosis via PI3K/Akt activation [J]. Int J Biol Macromol，2025，303：140662. DOI：10.1016/j.ijbiomac.2025.140662.

[7] YU H，NISHIO H，BARBI J，et al. Neurotrophic factor neuritin modulates T cell electrical and metabolic state for the balance of tolerance and immunity [J]. bioRxiv，2024：2024.01.31.578284. DOI：10.1101/2024.01.31.578284.

[8] ZHAO QR，LU JM，YAO JJ，et al. Neuritin reverses deficits in murine novel object associative recognition memory caused by exposure to extremely low-frequency（50 Hz）electromagnetic fields [J]. Sci Rep，2015，5：11768. DOI：10.1038/srep11768.

[9] SONG DD，LI GX，HONG Y，et al. miR-199a decreases neuritin ex-

pression involved in the development of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice [J]. Int J Mol Med, 2020, 46 (1): 384-396. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4602.
[10] LI CJ, LI JJ, JIANG Y, et al. Decreased cpg15 augments oxidative stress in sleep deprived mouse brain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522 (3): 749-756. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.11.132.
[11] YANG L, WANG XH, SUN JW, et al. Neuritin promotes angiogenesis through inhibition of DLL4/Notch signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2021, 53 (6): 663-672. DOI: 10.1093/abbs/gmab039.
[12] ZHANG YH, ZHANG SJ, XIAN LL, et al. Expression and purification of recombinant human neuritin from Pichia pastoris and a partial analysis of its neurobiological activity in vitro [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99 (19): 8035-8043. DOI: 10.1007/s00253-015-6649-3.6649-3.
[13] WANG HY, LI XL, SHAN LY, et al. Recombinant hneuritin promotes structural and functional recovery of sciatic nerve injury in rats [J]. Front Neurosci, 2016, 10: 589. DOI: 10.3389/fnins.2016.00589.
[14] GAO R, LI X, XI S, et al. Exogenous neuritin promotes nerve regeneration after acute spinal cord injury in rats [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27 (7): 544-554. DOI: 10.1089/hum.2015.159.2015.159.
[15] WU YC, GONG YQ, ZHOU LQ, et al. Performance of urine DNA neuritin 1 methylation test for urothelial carcinoma detection [J]. Mol Biomed, 2025, 6 (1): 8. DOI: 10.1186/s43556-025-00245-y.00245-y.
[16] DU WS, GAO AA, HERMAN JG, et al. Methylation of NRN1 is a novel synthetic lethal marker of PI3K-Akt-mTOR and ATR inhibitors in esophageal cancer [J]. Cancer Sci, 2021, 112 (7): 2870-2883. DOI: 10.1111/cas.14917.
[17] NAEVE GS, RAMAKRISHNAN M, KRAMER R, et al. Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (6): 2648-2653. DOI: 10.1073/pnas.94.6.2648.
[18] ZHANG P, LUO X, GUO Z, et al. Neuritin inhibits Notch signaling through interacted with neuralized to promote the neurite growth [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 179. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00179.
[19] KOJIMA N, SHIOJIRI N, SAKAI Y, et al. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration [J]. FEBS Lett, 2005, 579 (21): 4562-4566. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.07.015.
[20] FRANCIS SM, LARSEN JE, PAVEY SJ, et al. Expression profiling identifies genes involved in emphysema severity [J]. Respir Res, 2009, 10 (1): 81. DOI: 10.1186/1465-9921-10-81.
[21] WANG L, YANG WM, SONG Y. Impairing ferroptosis through the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway: the way for nerve growth factor to mitigate hypoxia-induced cardiomyocyte Damage [J]. Cell Biochem Biophys, 2024. DOI: 10.1007/s12013-024-01613-1.
[22] MAROOFI A, SAFARI F, ABBASI A. BDNF-induced BDNF release: a virtuous loop for the cardioprotective effects of exercise in post-ischemic heart failure [J]. Int J Cardiol Heart Vasc, 2025, 56: 101623. DOI: 10.1016/j.ijcha.2025.101623.
[23] ARAS ŞY, SARı EK. An immunohistochemical examination of cinnamon extract administration on distribution of NGF (nerve growth factor) and Trk-A (tyrosine kinase-A) receptor for diabetic rats with pancreatic tissue [J]. Turk J Med Sci, 2021, 51 (5): 2771-2785. DOI: 10.3906/sag-2012-270.
[24] LUCINI C, MARUCCIO L, ARCAMONE N, et al. Neurotrophin-like immunoreactivity in the gut of teleost species [J]. Neurosci Lett, 2003, 345 (1): 33-36. DOI: 10.1016/s0304-3940(03)00489-0.

（编辑　武玉欣）

（上接第504页）

Virol Sin, 2023, 38 (6): 851-859. DOI: 10.1016/j.virs.2023.10.007.
[8] CACOUB P, ASSELAH T. Hepatitis B virus infection and extrahepatic manifestations: a systemic disease [J]. Am J Gastroenterol, 2022, 117 (2): 253-263. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001575.
[9] ZHENG JR, WANG ZL, FENG B. Hepatitis B functional cure and immune response [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1075916. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1075916.
[10] MAZZARO C, ADINOLFI LE, POZZATO G, et al. Extrahepatic manifestations of chronic HBV infection and the role of antiviral therapy [J]. J Clin Med, 2022, 11 (21): 6247. DOI: 10.3390/jcm11216247.
[11] SANDMANN L, CORNBERG M. Towards eradication of HBV: treatment approaches and status of clinical trials [J]. Curr Opin Pharmacol, 2021, 60: 232-240. DOI: 10.1016/j.coph.2021.07.008.
[12] FUNG S, CHOI HSJ, GEHRING A, et al. Getting to HBV cure: the promising paths forward [J]. Hepatology, 2022, 76 (1): 233-250. DOI: 10.1002/hep.32314.
[13] JOSE-ABREGO A, ROMAN S, LAGUNA-MERAZ S, et al. Host and HBV interactions and their potential impact on clinical outcomes [J]. Pathogens, 2023, 12 (9): 1146. DOI: 10.3390/pathogens12091146.
[14] LI H, YAN LB, SHI Y, et al. Hepatitis B virus infection: overview [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179: 1-16. DOI: 10.1007/978-981-13-9151-4_1.
[15] ZHONG SH, ZHANG TL, TANG LB, et al. Cytokines and chemokines in HBV infection [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 805625. DOI: 10.3389/fmolb.2021.805625.

（编辑　于　溪）