

高温诱导金黄仓鼠胚神经上皮细胞 基因的差异表达*

李如江 管英俊 李锋杰

(潍坊医学院组织学与胚胎学教研室 潍坊 261042)

摘要:以 mRNA 差异显示法研究高温作用后金黄仓鼠胚神经上皮细胞基因的差异表达。结果表明,高温处理后第 16 h,从鼠胚神经上皮细胞基因表达中检出两条良好重复性差异序列。该差异序列为未知序列,属新 EST,提示高温可能诱导金黄仓鼠胚神经上皮细胞基因表达发生变化。

关键词:神经上皮细胞;高温;金黄仓鼠

中图分类号:Q751 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2003)03-77-04

Induction of Differentially Expressed Genes in the Neural Epithelial Cells of *Mesocricetus auratus* Embryos by Maternal Hyperthermia

LI Ru-Jiang GUAN Ying-Jun LI Feng-Jie

(Department of Histology and Embryology, Weifang Medical College, Weifang 261042, China)

Abstract: Differentially expressed genes in the neural epithelial cells of *Mesocricetus auratus* embryos induced by maternal hyperthermia were analyzed via mRNA differential display. In conclusion, two good duplicate differential sequences were obtained in the neural epithelial cells of the hamster embryos. The sequences were identified to the new expressed sequence tags, which showed that changes in gene expression may be induced by hyperthermia.

Key words: Neural epithelial cell; Hyperthermia; *Mesocricetus auratus*

高温是自然环境、劳动环境和多种疾病中常常出现的致畸因素,但高温致畸的分子机制迄今尚未阐明^[1-3]。本实验以 mRNA 差异显示法(mRNA differential display, mDD)研究高温作用后神经上皮细胞基因表达的差异,揭示高温诱导神经上皮细胞损伤的机制,为高温致畸的预防提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物和试剂 金黄仓鼠由卫生部生物制品研究所提供,TRIZOL 试剂购自 GIBCOBRL 公司,差异显示试剂为 CLOTECH 产品,聚丙烯酰胺凝胶制备、银染、克隆及测序试剂皆购自 Promega 公司。

1.2 抽提总 RNA 将 12 只金黄仓鼠孕鼠随机分为实验组和对照组,孕第 8 d 下午 4 时,实验组 42℃ 水浴 20 min,对照组 37℃ 水浴 20 min。处理后第 16 h 颈椎脱臼

处死,解剖镜下分离其胚胎神经管,迅速液氮冷冻, -70℃ 冻存。

实验组、对照组的神经管分别以 TRIZOL 一步法提取总 RNA^[4],RNase-free DNase I 消化总 RNA 中残存的染色体 DNA^[4],以甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性^[5]。

1.3 逆转录 调整上述 RNA 含量至 1 μg/μl,取 2 μl 为模板(其余 -70℃ 冻存),加入 1 μmol/L Oligo(dT) primer 1 μl、DEPC-dH₂O 3 μl,混匀,70℃ 3 min,冰浴 2 min。加入 5 × First-Strand buffer 2 μl、5 mmol/L dNTP mix 2 μl 和 200 U/

* 卫生部优秀青年科技人才专项基金资助 (No. 1999BA2CCA1);

第一作者介绍 李如江,男,34 岁,硕士;研究方向:神经内分泌的基础研究。

收稿日期:2002-08-01,修回日期:2003-01-06

μl MMLV reverse transcriptase 1 μl, 混匀, 42℃ 60 min。75℃ 10 min 终止反应, 冰浴后, -20℃ 冻存。

1.4 PCR 扩增 反应体系 20 μl, 其中 10 × PCR buffer 2 μl, 50 mmol/L MgCl₂ 0.6 μl, 5 mmol/L dNTP 0.8 μl, 20 μmol/L 任意引物 P1/2/4/5 之一 0.5 μl, 20 μmol/L 锚定引物 T2/3/4 之一 0.5 μl, 逆转录产物 0.3 μl, dH₂O 15.1 μl。石蜡油封盖。94℃ 变性 5 min, 复性至 80℃ 时加入 5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μl。循环参数如下: 第 1 循环 94℃ 5 min, 40℃ 5 min, 68℃ 5 min; 第 2~3 循环 94℃ 30 s, 40℃ 30 s, 68℃ 5 min; 第 4~30 循环 94℃ 20 s, 60℃ 30 s, 68℃ 2 min; 68℃ 延伸 7 min。每对引物, 实验组至少扩增两次, 同时对对照组也做相应扩增。反应产物 -20℃ 冻存。

6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染显色^[2], 差异片段的回收及再扩增^[2], 以 PCR-SSCP 对差异片段的多样性进行估计, 差异片段的克隆、测序^[5]。

2 结果和讨论

用 TRIZOL 一步法提取的实验组、对照组神经管总 RNA, 经 RNase-free DNase I 消化后无降解 (图 1)。以 P4、T4、P1、T3 为引物组合的 PCR, 检出 2 条重复性差异带 (图 2), 前者仅出现于实验组, 后者仅存在于对照组, 其余 9 种引物组合未见重复性差异带 (差异片段回收再扩增结果见图 3, 差异片段的克隆结果见图 4~5)。该两条差异序列经 GenBank 数据库查询无高度同源序列, 为新 EST, 申请的序号分别为 dbEST-Id: 9267392/GenBank-Accn: BI430999、dbEST-Id: 9267393/GenBank-Accn: BI431000 (该序列已录入 GenBank 数据库)。

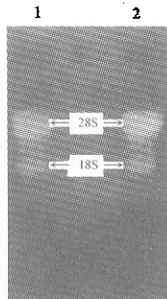


图 1 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

1. 实验组; 2. 对照组。皆可见清晰的 18S rRNA、28S rRNA 两条带, 28S 的丰度为 18S 的数倍, 加样孔处未见荧光

2.1 mDD 方法的选用和改进 本实验对象为金黄仓鼠胚胎早期神经管, 其量小, 所能提取的总 RNA 量亦少, 为此, 作者选用了所需起始材料少的 mDD (所需总 RNA 的量约 0.5 μg^[6]) 研究高温作用后神经上皮细胞基因的差异表达。

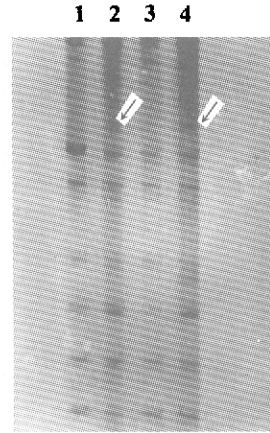


图 2 以 P4、T4 为引物的差异显示 PCR 产物 PAGE 银染结果

1,3. 对照组; 2,4. 实验组

箭头所指为仅出现于实验组的差异带

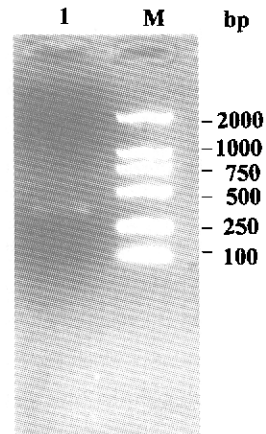


图 3 以 P4、T4 为引物的差异片段再次 PCR 产物 (1% 琼脂糖凝胶电泳)

M. DL2000 Marker; 1. 再次 PCR 扩增的差异片段, 约 350 bp

为降低 mDD 方法的假阳性率, 本实验对经典 mDD 做了一些改进。以 RNase-free DNase I 消化总 RNA 中残存的染色体 DNA, 减少了非相关带的检测。选用了 CLOTECH 公司优化的任意引物和锚定引物, 即在传统任意引物 5' 端加入 5'-ATTAACCCCTCACTAAA、锚定引物 5' 端引入了 5'-CATTATGCTGACTGA TATC 序列, 由于引物的延长, DD-PCR 第 1~3 个循环虽是 40℃ 不严格复性, 第 4~30 个循环则是 60℃ 严格复性, 与传统 DD-PCR 引物和模板 40℃ 不严格复性相比, 此策略极大增强了 DD-PCR 的特异性, 减少了非特异性扩增。DD-PCR 选用了热启动 PCR, 即在第 1 循环变性退火到 80℃ 时加入 *Taq* DNA 聚合酶, 可有效避免错配引物的延伸, 增加反

应的特异性。因以银染显示凝胶带纹, DD-PCR 无需放射性同位素 dATP 的掺入, 故 dNTP 使用了 PCR 标准浓度 (200 $\mu\text{mol/L}$), 此策略可提高扩增效率, 显示低拷贝差异表达基因, 也避免了放射性同位素的污染和对人体的危害, 同时银染显示凝胶带纹, 可精确切取差异带, 避免了传统方法误切差异带造成的假阳性。以 PCR-SSCP 估计再次 PCR 产物的多态性, 使后续克隆测序的目的性大大增强。

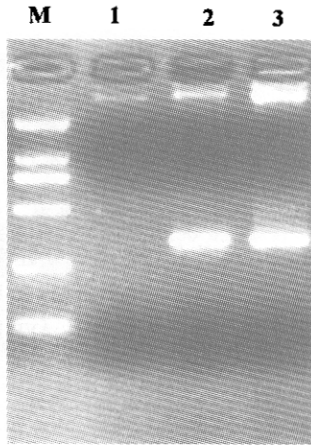


图4 克隆中抽提的质粒 PCR 鉴定
(1% 琼脂糖凝胶电泳)

M. DL2000 Marker; 1. 以 P4、T4 为引物的空质粒 PCR 扩增结果; 2, 3. 以 P4、T4 为引物的差异片段重组质粒扩增条带, 其最下方为插入片段扩增带, 约 350 bp

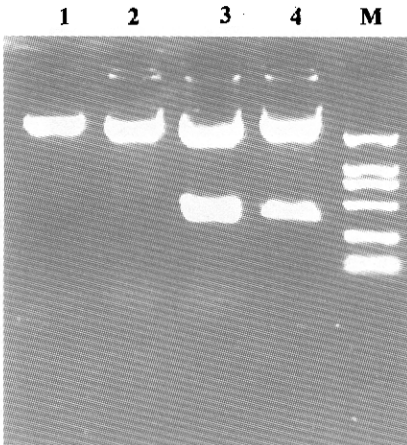


图5 克隆中抽提的质粒酶切鉴定
(1% 琼脂糖凝胶电泳)

1, 2. 空质粒酶切条带; 3, 4. 以 P4、T4 为引物的差异片段重组质粒酶切条带, 其最下方为酶切的差异条带, 约 350 bp; M. DL2000 Marker

2.2 高温强度及高温作用后时间点的选择 依据 1996 年吕锋等的报道^[7], 在孕第 8 d, 以 42℃ 水浴 20 min 建立高温致畸神经管模型。结合 1998 年马金龙等的研究 (42℃ 20 min 后第 8 h, 金黄仓鼠胚胎神经上皮细胞凋亡开始增加, 第 16 h 达到高峰, 第 24 h 恢复正常), 选择高温作用金黄仓鼠孕鼠后第 16 h 分离胚胎神经管, 研究其基因表达变化。

2.3 高温诱导金黄仓鼠胚胎神经上皮细胞基因表达发生变化 1997 年 Finnell 等^[8] 提出的高温致畸热休克理论认为, 胚胎细胞受到高温作用后, 胚胎内多数蛋白的合成, 特别是与胚胎细胞分化发育密切相关的蛋白合成受到抑制, 编码这些蛋白的基因处于暂时的休克状态。与此同时热应激基因却被高温激活表达应激蛋白, 以保护细胞的正常分化发育。细胞的这种保护性应激反应称为热休克反应, 所产生的应激蛋白称为热休克蛋白。但是, 热休克反应、热休克蛋白及其保护作用是有一定限度的, 如果高温强度和持续时间超过一定的限度, 发育中的胚胎细胞就会发生不可逆性损伤, 并随损伤程度的不同而出现发育迟缓、胚胎畸形或胚胎死亡。本实验显示, EST 9267392 仅出现于实验组 (高温处理组), 提示高温可诱发胚胎神经上皮细胞某基因的表达; EST 9267393 仅出现于对照组, 表明高温又可抑制胚胎神经上皮细胞某基因的表达。这一实验结果与上述理论相一致, 并为其提供了实验依据。但 EST 9267392、EST 9267393 所属基因全长及其功能是什么, EST 9267392 编码哪种与神经管分化发育密切相关的蛋白质, EST 9267393 是否为热休克蛋白基因等一系列问题, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Upfold J B, Smith M S, Edwards M J. Quantitative study of the effects of maternal hyperthermia on cell death and proliferation in the guinea pig brain on day 21 of pregnancy. *Teratology*, 1989, 39(2): 173 ~ 179.
- [2] Vacha S J, Bennett G D, Mackler S A, et al. Identification of a growth arrest specific (gas 5) gene by differential display as a candidate gene for determining susceptibility to hyperthermia-induced exencephaly in mice. *Dev Genet*, 1997, 21(3): 212 ~ 222.
- [3] Graham J M Jr, Edwards M J, Edwards M J. Teratogen update: Gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. *Teratology*, 1998, 58(5): 209 ~ 221.
- [4] 李炎, 徐群源. 用 mRNA 差异显示法寻找帕金森病猴模型的相关基因. *神经解剖学杂志*, 1998, 14(4): 328 ~ 332.

- [5] J. 萨姆布鲁克等主编[美]. 分子克隆(第2版). 北京: 科学出版社, 1999. 366, 16, 602. 277.
- [6] Liang P, Pardee A B. Differential display. A general protocol. *Mol Bio-technol*, 1998, 10(3): 261 ~ 267.
- [7] 吕锋, 高英茂, 管英俊. 高温致神经管畸形动物模型的建立及其形态发生的研究. *解剖学报*, 1996, 27(3): 273 ~
- [8] Finnell R H, Wlodarczyk B C, Craig J C. Strain-dependent alterations in the expression of folate pathway genes following teratogenic exposure to valproic acid in a mouse model. *Am J Med Genet*, 1997, 70(3): 303 ~ 311.