文章编号:1000-5404(2005)17-1719-03

论著

小鼠组织中 Cxcl15 mRNA 表达及其在肺组织中的的定位特征

黄 文,朱佩芳,王正国,冯 刚,杨志焕 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 观察 Cxcl15(chemokine,C-X-C motif, ligand 15)基因在小鼠体内的表达分布规律。**方法** 采用 Northern,将小鼠 Cxcl15 基因与小鼠 8 种主要组织来源的 Poly A$^+$ RNA 印迹膜进行杂交,观察该基因在小鼠各种组织中的分布规律;采用原位杂交,观察该基因在小鼠肺组织中的分布规律。**结果** Cxcl15 基因主要在小鼠肺组织支气管上皮细胞胞浆中表达,并可能存在不同亚型。**结论** Cxcl15 基因的表达存在组织特异性。

关键词: Cxcl15 基因;Northern blotting;原位杂交;创伤反应差异
中图法分类号: R322.35; R394.33; R394.2 **文献标识码:** A

Cxcl15 mRNA expression in mouse tissue and localization in mouse lung

HUANG Wen, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, FENG Gang, YANG Zhi-huan (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe distribution characteristic of Cxcl15 gene in mouse. **Methods** The Northern blotting was applied to analyze the distribution characteristic of Cxcl15 gene in mouse tissue and *In situ* hybridization for the distribution characteristic of Cxcl15 gene in the mouse lung. **Results** Cxcl15 gene mainly expressed in cytoplasma of bronchial epithelium in the mouse lung and maybe have two different isoforms. **Conclusion** The expression of Cxcl15 gene was of tissue specificity.

Key words: Cxcl15 gene; Northern blotting; *in situ* hybridization; heterogeneity of traumatic responses

我们前期的研究观察到并验证了 BALB/c 和 C57BL/6 两近交系小鼠间存在的对全身冲击伤的反应差异现象[1],进一步研究提示 Cxcl15 基因极可能参与了创伤反应差异性现象[2]。下一步的工作拟通过各种途径了解 Cxcl15 基因的功能从而为理解该基因在创伤反应差异性现象中的作用提供相关线索,而了解该基因在机体内的分布特性无疑有助于对该基因功能的了解,为此我们采用 Northern 和原位杂交技术对 Cxcl15 基因在小鼠各种组织和肺组织中的分布特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

杂交炉(Robbins Scientific);Personal molecular imager FX 图像采集系统(Bio-Rad);VersaDOC™ imager system (Moder 3000, Bio-Rad);Tripure (Roche);CHROMA SPIN Cloning Kit (Clontech);Mouse MTN Blot (Clontech);α-^{32}P-d CTP(北京亚辉生物科技公司);PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech);ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech);地高辛随机引物标记和检测试剂盒(MK1010,武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 探针的制备、纯化和标记

1.2.1 探针引物序列 由上海申友公司合成:上游 5′-TTAGCTCACAACAGTGATAGG-3′;下游 5′-GTCACCTGTGAACATTCACT-3′。

1.2.2 PCR 反应体系及反应条件 模板 1 μl;缓冲液 10×5 μl;$MgCl_2$(25 mmol/L) 5 μl;dNTP (10 mmol/L)1 μl;Primer F (20 pmol/μl) 0.8 μl;Primer R (20 pmol/μl) 0.8 μl;*Taq* 酶 (5 U/μl) 0.5 μl;加水调节反应体积到 50 μl。PCR 反应条件:94 ℃ 2 min;94 ℃ 10 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,45 个循环;72 ℃ 10 min。

1.2.3 从凝胶中回收纯化探针 1% 琼脂糖凝胶电泳;用干净的小刀将所需片段(紫外灯下)切下,放入 1 个干净的 10 ml 试管中;按每 100 mg 加入 300 μl NT1 缓冲液的量加入 NT1 相应的体积;将试管放入 50 ℃水浴箱内水浴 10 min,每 2~3 min 振动试管 1 次;准备 1 个干净的 2 ml 收集管,收集管上放 1 个

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G1999054203) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054203)
作者简介:黄 文(1972-),男,重庆市人,博士,助理研究员,主要从事创伤反应差异的遗传机制方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)66154240
通讯作者:朱佩芳,电话:(023)68757864
收稿日期:2004-08-23;修回日期:2004-12-09

干净的过滤管,将凝胶溶解后的溶液放入过滤管内,室温下高速离心 1 min,弃去收集管内的过滤液;将该过滤液内加入 700 μl 的 NT3 缓冲液,同样,室温下高速离心 1 min,弃去收集管内的过滤液,重复此步骤 1 次;重换 1 个干净收集管,室温下高速离心 1 min,以除去过滤管内残留的 NT3 缓冲液;将过滤管放到 1 个新的干净的 1.5 ml EP 管上,加入 50 μl 的 NE 缓冲液,室温下高速离心 1 min,其滤出液即为纯化后的探针。

1.2.4 随机引物标记 cDNA 探针及纯化 具体操作参考文献[3]。

1.3 Northern 检测 Cxcl15 基因在小鼠各组织中的分布

具体操作(包括杂交、洗膜、显影等)参考文献[3],将小鼠 Cxcl15 基因与小鼠 8 种主要组织来源的 Poly A$^+$ RNA 印迹膜进行杂交。

1.4 原位杂交检测 Cxcl15 基因在小鼠肺组织中的分布

1.4.1 探针的地高辛标记(浓度为 2 ~ 5 ng/μl) 用灭菌去离子水稀释 1 μg DNA 至总体积为 16 μl;DNA 热变性:把 DNA 瓶置于沸水中,水浴 10 min,迅速插入碎冰中 3 min 以上;加 4 μl DIG Random Labeling Mix(高效),混匀后2 000 r/min 离心 5 min;置 37 ℃反应 120 min。时间越长,产量越高。延长反应时间至 20 h 可明显增加产量;加入 2 μl (10 mmol/L) EDTA 以终止反应。上述液体可于 -20 ℃保存 1 年。

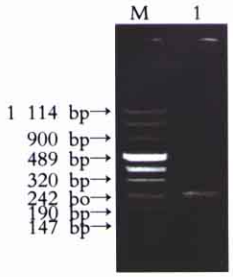
1.4.2 杂交前组织准备 乙醚麻醉后,开胸,由心尖偏左进针,斜向上内方向穿刺,深度约为 0.3 ~ 0.5 cm,穿入左心室,用 100 ml 生理盐水和 4% 多聚甲醛主动脉灌注固定。固定 0.5 h 后,取出组织块,放入 4 ℃环境中,4% 多聚甲醛后固定 4 ~ 6 h。组织切片:在本研究室进行石蜡切片。

1.4.3 杂交、杂交后处理、显色 具体操作参考文献[4]进行。

2 实验结果

2.1 探针制备结果

在具体 Northern 和原位杂交实验前,我们采用 RT-PCR 方法制备探针,探针条带大小约为 246 bp。将探针片段送上海申友公司测序,测序结果到 NCBI 在线服务器中比对,证明该片段为我们需要探针(图 1)。



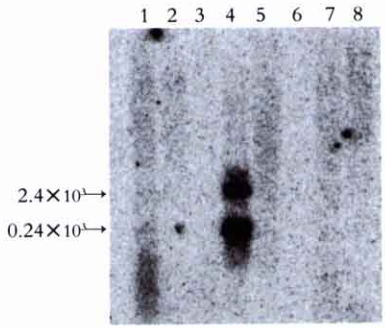
M: marker; 1: probe

图 1 探针电泳结果

Fig 1 Electrophoretic results of probe

2.2 Cxcl15 基因在小鼠各组织中的分布

采用 Northern 的实验方法,将小鼠 Cxcl15 基因与小鼠 8 种主要组织来源的 Poly A$^+$ RNA 印迹膜进行杂交,结果见图 2。



1: Heart; 2: Btain; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Liver; 6: Skeleton; 7: Kidney; 8: Testis

图 2 Cxcl15 基因在小鼠 8 种主要组织中的分布

Fig 2 Distribution of Cxcl15 gene in mouse tissue

该实验结果提示 Cxcl15 基因在小鼠肺中特异性表达,有着表达的组织特异性。而且该实验结果提示可能存在 Cxcl15 基因的不同亚型,其分子量分别为 1 kb 和 2.4 kb 左右。

2.3 Cxcl15 基因在小鼠肺组织中的分布

采用原位杂交的方法,对 Cxcl15 基因在小鼠肺组织中的分布特性进行了研究,使用地高辛随机引物标记法,检测系统抗体为抗地高辛单抗,标记碱性磷酸酶,BCIP/NBT 显色,结果为背景为蓝色,阳性部位为蓝紫色,原位杂交结果提示:Cxcl15 基因主要在支气管上皮细胞的胞浆中表达,不排除在胞核中表达(图 3)。

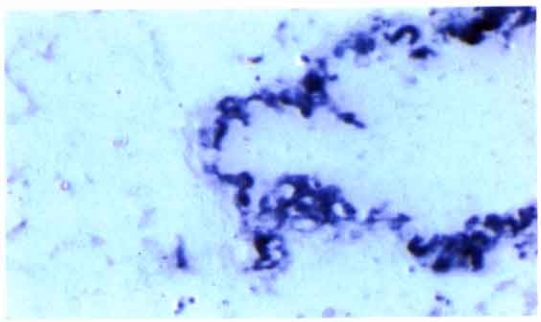


图 3 Cxcl15 基因在小鼠肺组织支气管上皮细胞胞浆中表达 (BCIP/NBT ×400)

Fig 3 Cxcl15 gene mainly expressed in cytoplasm of bronchial epithelium and tracheal epithelium in mouse lung (BCIP/NBT ×400)

3 讨论

目前关于 Cxcl15 的研究报道尚不多,但已有的报道和分析均提示该基因功能复杂且重要。对其结构的研究表明 Cxcl15 基因属于趋化因子超家族中 ELR$^+$

CXC 趋化因子成员，该基因编码蛋白质分子具有较多的丝氨酸残基和蛋白激酶位点提示它是细胞信号转导通路中的成分。研究表明 Cxcl15 主要参与了各种形式引起的炎症反应[5,6]。Ohneda 等[7]使用消减抑制杂交的方法，从小鼠内皮细胞中筛选到一种新的造血调控因子，且被证实就是 Cxcl15，这表明该基因可能在血管的形成中发挥重要的作用。对该基因的生物信息学分析也提示该基因是一个高度保守的序列，具有重要功能。

本部分实验我们采用原位杂交和 Northern 的实验方法，对 Cxcl15 基因在小鼠各种组织以及肺组织中的分布特性进行了研究，实验结果提示 Cxcl15 基因在小鼠肺中特异性表达，有着表达的组织特异性，而且该基因主要在支气管上皮细胞的胞浆中表达，实验结果还提示可能存在 Cxcl15 基因的不同亚型，其分子量分别为 1 kb 和 2.4 kb 左右。上述结果给我们带来了一系列的思索，为什么该基因只在肺中特异性表达？这种特异性表达的病理生理意义及发生机制是什么？这种现象尤其是在创伤以及创伤反应差异中的可能意义？我们此前的研究[2]已经提示 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠间存在的创伤反应差异性可能与两系小鼠间 Cxcl15 基因的不同表达及两系小鼠间可能存在的肺血管结构的异质性相关，本部分的实验结果提示该基因在肺组织中特异性表达，这无疑与我们前期的研究结果是相吻合的，这也进一步提供了选择 Cxcl15 基因为研究对象的实验依据。

基因表达谱是揭示基因功能的重要线索。如果一个基因主要在某个组织中特异表达，那么这个基因的生理功能可能与该组织的特异性功能相关联[8]。具体到 Cxcl15 基因，我们认为本研究结果提示该基因可能与肺的某种特定功能有联系，而肺最主要和最特异性的功能，就是进行气体交换，为机体供氧，这就涉及到两个方面：一是气体物质交换的结构基础；二是在各种状态下（如：生理状态、创伤后应激状态等）对结构基础进行的调节，结合到 Cxcl15 基因属于趋化因子这一事实，又有研究[7]提示该基因编码蛋白质也是一种造血调控因子，并且已有研究提示[9]该基因所属 CXC 类趋化因子在血管的生成和血管的稳定中发挥重要作用，我们推测该基因可能在上述两个方面均发挥了作用，一方面该基因可能通过对血管形成的影响而形成先天性的结构基础，另一方面在血管形成以后又作为一种信号分子对血管的状态进行调节。结合我们前期对肺血管结构基础的研究结果，我们认为该基因可能是通过影响血管通透性相关结构基础的形成和对结构基础的调节而在肺损伤差异乃至创伤反应差异中发挥作用的，当然，由于我们对该基因了解还不多，还缺少对该基因在机体成长过程中的动态变化的规律等许多问题的了解，上述看法只是我们基于已有实验结果和生物信息学处理结果可能的推测，其理论上的可能性尚未有相关实验支持。另外，该基因是否的确存在两种亚型，如果的确存在，那么这种现象的原因和意义都需要我们继续不断的深入研究加以揭示，这也是我们下一步将要工作的方向之一。

参考文献：

[1] 冯　刚，王正国，杨志焕，等. C57BL/6 和 BALB/C 小鼠创伤反应差异性初步探讨[J]. 中华创伤杂志，2001，17(5)：301－303.

[2] 黄　文，朱佩芳，王正国，等. 两系创伤反应明显差异小鼠肺血管通透性及 Scyb15 基因基础表达量的比较研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1442－1445.

[3] 金冬雁，黎孟枫，张德政，等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 495－537，366－388.

[4] 颜子颖，王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 539－585.

[5] Chen S C, Mehrad B, Deng J C, *et al*. Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine[J]. J Immunol, 2001, 166(5): 3362－3368.

[6] Rossi D L, Hurst S D, Xu Y, *et al*. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells[J]. J Immunol, 1999, 162(9): 5490－5497.

[7] Ohneda O, Ohneda K, Nomiyama H, *et al*. WECHE: a novel hematopoietic regulatory factor[J]. Immunity, 2000, 12(2): 141－150.

[8] Schmitt A O, Specht T, Beckmann G, *et al*. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(21): 4251－4260.

[9] Strieter R M, Polverini P J, Kunkel S L, *et al*. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis[J]. J Biol Chem, 1995, 270(45): 27348－27357.

（编辑　汪勤俭）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn（校外稿件请邮寄）。

本刊编辑部