文章编号:1000-5404(2008)11-1099-03

短篇论著

针刺小鼠丰隆穴对代谢等相关基因表达的影响

康晋梅,李星洁,李 珉 (四川大学生命科学学院分子生物与生物技术重点实验室,成都 610064)

摘 要:目的 针刺小鼠丰隆穴(ST40),以高胆固醇血症疾病为模型,筛选和鉴定针刺治疗相关基因。方法 将小鼠分为正常组、疾病组和针治组,分别将以疾病模型小鼠和针治小鼠肝组织的 cDNA 为 Tester,以正常小鼠肝组织的 cDNA 为 Driver,应用抑制消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization,SSH)和斑点杂交筛选方法,筛选针刺治疗特异表达基因。结果 成功构建正常组消减疾病组 cDNA 消减文库和正常组消减针治组 cDNA 消减文库。在此基础上通过对两个消减文库斑点杂交,筛选出针刺治疗特异表达基因 7 个,其中未知功能基因 1 个。结论 SSH 技术是筛选新功能基因的有效方法,通过对筛选的 6 个已知功能基因的分析,推测针刺治疗疾病影响基础代谢、细胞生长和信号传递等方面的基因表达,为研究针刺治疗疾病的分子机理提供理论依据和实验依据。

关键词:针刺治疗;抑制消减杂交;斑点杂交
中图法分类号:R245.3;R394-33;R394.3 文献标识码:A

针刺和电针治疗都被证明是一种十分有效的治疗方法,应用于治疗疼痛、癌症、高血压、高血脂、糖尿病[1]、心肌缺血、心悸、心血管疾病[2]、缓解压力和治疗炎症等,都取得了良好的效果。从针刺同一个穴位可以治疗多种不同病症的临床实践来看[3],针刺治疗疾病的分子机制可能是通过影响两类基因的表达来实现:一是影响与疾病相关的代谢基因;二是影响整个机体的基础代谢基因。本研究以高胆固醇血症为疾病模型,以针刺小鼠丰隆穴为研究对象,采用抑制消减杂交方法(suppression subtractive hybridization,SSH)[4,5]筛选针刺特异表达基因,为探索针刺治疗疾病的分子机理提供理论依据和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、组织和试剂

小鼠品系:近交系 C57BL/6J 雄性小鼠,购自国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心。在成都中医药大学实验动物中心按一级动物饲养。动物模型:正常小鼠组;高胆固醇血症疾病小鼠模型组;针刺丰隆穴治疗高胆固醇血症小鼠模型组,由本实验室建模[6]。实验组织:上述 3 组小鼠的肝脏组织。所用菌株和试剂:*Escherichia coli* 菌株 JM109 和质粒 pUC18,由本实验室保存。载体 pMD18-T,购自 TaKaRa 公司。Pyrobest DNA polymerase,*Taq* DNA polymerase,ligation kit,pMD18-T 为 TaKaRa 公司产品;PCR 纯化试剂盒为 Omega 公司产品。其余试剂均为进口试剂。

1.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离纯化

分别取正常组、疾病组和针治组小鼠肝脏组织约 100 mg 使用 Trizol 试剂提取总 RNA。总 RNA 经 Qiagen 的 Oligotex-dT mRNA Midi Kit 进行纯化获得 mRNA。

作者简介:康晋梅,女,山西省临县人,硕士研究生,讲师,主要从事分子生物学方面的研究。电话:15984658291,E-mail:phnix777@163.com
通信作者:李 珉,电话:(028)85402738
收稿日期:2008-01-18;修回日期:2008-04-10

1.3 抑制消减杂交(SSH)筛选差异表达基因

按照 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒操作说明,将 tester(疾病组和针治组)和 driver(正常组)mRNA 分别反转录合成 cDNA,经 *Rsa* Ⅰ酶切成平头末端片段;把 tester cDNA 分别均分为两份,然后分别与接头 1 和 2R 连接,进行连接效率分析;再分别与变性的过量 driver cDNA 杂交;杂交后,将两份样本混合再继续与变性的 driver cDNA 杂交;杂交后进行第 1 轮抑制 PCR,后由巢式 PCR 进行第 2 轮扩增并检测杂交效率。

1.4 消减文库的构建

将经过 2 轮 PCR 扩增后的杂交产物,与 T 载体进行连接,并进行转化。挑取转化平板上的菌落,提取质粒进行酶切,鉴定阳性克隆。

1.5 斑点杂交[7]

本实验采用 PIERCE 公司的 North2South™ Biotin Random Prime Kit,所有试剂均由 PIERCE 公司提供。通过斑点杂交首先去除假阳性,然后筛选特异表达基因。具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 序列测定和分析

通过斑点杂交筛选法富集的针治特异性表达基因,经序列测定后使用 Blast 与 GenBank 中的序列进行同源性比对,并进行小鼠基因组的定位和功能预测。

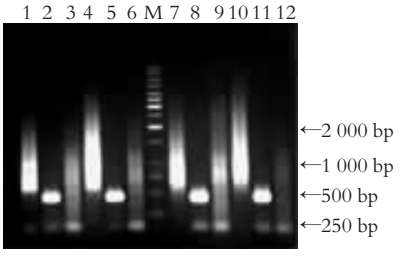
2 结果

2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

从紫外分光光度计测定结果显示,肝脏总 RNA $D(260)/D(280)$ 比值均≥ 2,表示可以进行后续实验。

2.2 抑制消减杂交筛选差异表达基因

2.2.1 接头连接效率的检测 疾病组和针治组的 tester 接头的连接,图 1 琼脂糖凝胶电泳显示用 G3PDH 3′引物和 PCR 引物 1 扩增的产物条带亮度与用 G3PDH 3′引物和 G3PDH 5′引物扩增的产物条带亮度比值在 0.25 以上,表明连接反应效率很高,可用于杂交筛选步骤。



1–6:疾病组2种接头连接;7–12:针治组2种接头的连接;1,4,7,10:G3PDH的3′–端引物与接头外侧引物primer1扩增产物K1;2,5,8,11:G3PDH的3′-和5′-端引物扩增产物G3PDH;3,6,9,12:G3PDH的3′-端引物和接头内侧的Nested引物扩增产物K2;M:标准

图1 Tester接头连接效率检测

2.2.2 **消减效率检测** 为了评价效率,以G3PDH基因在消减杂交前后的cDNA的第2次PCR产物量的差异进行评价。正常组消减疾病组前的cDNA在18个循环就出现扩增带,而消减产物在23个循环才有比较弱的DNA带。说明消减效率至少高达2^5倍。正常组消减针治组的效率更是高达2^{10}倍。

2.2.3 **差异基因消减文库的建立** 将SSH杂交后的第2轮PCR产物纯化后与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌,在2个消减样品的转化子中各自随机选取150个质粒建立了消减cDNA文库。

2.3 斑点杂交消除假阳性

采用斑点杂交方法分别对2个抑制消减文库消除假阳性。分别以疾病组cDNA和针治组cDNA为探针,分别与正常消减疾病组的文库质粒DNA和正常消减针治组的文库质粒DNA杂交。未杂交斑点为假阳性克隆。图2a,b分别是SSH文库质粒的斑点杂交结果。



a、b分别为疾病组和针治组的cDNA探针,正常消减针治组的文库质粒DNA

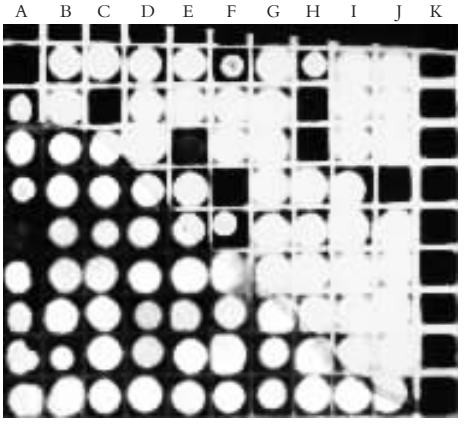
A列为空载体;B–O列为质粒DNA

图2 SSH文库质粒斑点杂交分析

从斑点杂交的结果可以看出,2个消减文库的假阳性克隆率是比较高的。通过抑制消减杂交方法建立的2个消减文库各有150个质粒。通过斑点杂交,正常消减模型组文库得到的阳性克隆为65个,占总克隆数的43.33%;而正常消减针治组文库得到的阳性克隆为90个,占总克隆数的60%。

2.4 针治特异表达基因的筛选

从疾病组中筛选到的阳性克隆基因为疾病特异性表达基因,而从针治组中筛选到的阳性克隆基因,包含了从疾病组中筛选的疾病特异性表达基因和针治特异性表达基因,因此将从疾病组中筛选到的基因片段标记为探针,与从针治组中筛选到的基因片段进行斑点杂交。未杂交斑点为筛选出的针治特异表达基因。图3为斑点杂交筛选的结果。其中A-J列为正常消减疾病组阳性克隆质粒DNA。K1-K5为空载体,K6-K9为空白对照。从杂交结果可以表明,筛选到7个针治特异表达基因。杂交斑点为阴性结果是与高胆固醇血症疾病有关的基因。



探针:正常消减疾病组文库质粒DNA,斑点:正常消减针治组文库质粒DNA;A–K列为质粒DNA

图3 斑点杂交筛选针治特异表达基因

2.5 针治特异性表达基因的序列分析

通过对筛选的基因进行测序和序列比对,分析结果显示,除1个基因功能未知外(RP23-370C18),其余6个基因的功能均是已知的。它们所编码蛋白质的功能是:泛醇-细胞色素C还原酶复合体(ubiquinol-cytochrome c reductase complex),细胞色素b5(cytochrome b5),NADH脱氢酶1α[NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha]参与基础代谢;磷酸化酶激酶β(phosphorylase kinase, beta)和酪蛋白激酶1γ3(casein kinase 1, gamma 3)与信号传导有关;微管蛋白β2c(tubulin, beta 2c)与细胞生长有关。

3 讨论

本试验选用的针刺穴位为丰隆穴。丰隆(ST40)为足阳明胃经的络穴,针刺该穴能疏通表里两经之气血,即"一络通二经"。针刺丰隆穴治疗高胆固醇血症已拟收入正在编纂的《中华人民共和国穴典》(见国家中医药管理局《中华人民共和国穴典》腧穴主治临床研究项目课题招标指南,2002年7月8日)。因此这个模型可以用来筛选针刺治疗特异性基因。在针灸学的实验研究中,最常用的实验动物之一为小鼠。为了规范动物实验,中国针灸学会实验针灸研究会制定了"动物针灸穴位图谱"供研究者参考。同时,筛选针刺

治疗特异性基因，需要在基因组水平上进行。目前在分子水平开展的研究工作[8]，多数以具体的疾病为对象，研究与之相关的基因，很少从基因组水平上进行研究。利用基因芯片技术开展基因组水平的研究，会使研究者面对成百上千个基因，难于突出针刺特异性表达基因。因此，我们在本实验中采用 SSH 技术，既从整体上研究基因的表达，又希望能够从中筛选出针刺特异性表达基因。

虽然 SSH 实验可以在很大程度上对差异表达的基因片段进行富集，可是随着实验材料基因组序列的复杂化，不可避免的会产生一些背景——假阳性克隆[9]。因为在 2 个进行消减的基因组 cDNA 文库中，差异表达的 mRNA 种类非常少。一般来说，差异表达的 mRNA 越少，量的差别越小，意味着越高的背景—即使获得了较好的差异表达 cDNA 的富集。为了使目的基因片段不被背景片段所掩盖，以获得预期的针刺特异表达基因，有必要对所得的抑制消减 cDNA 文库进行假阳性克隆的去除。在本实验中我们通过斑点杂交对假阳性克隆进行了一次消除，然后在此基础上进行了针刺特异表达基因的筛选。

在筛选到的 7 个可能与针刺治疗疾病特异表达的相关基因中，除 1 个是未知功能基因外，其余 6 个已知功能的基因可以归类为基础代谢相关基因，细胞长相关基因及信号传导相关基因。细胞色素 b5[10] 与被称为氰感受因子的酶一起，参与由氧将饱和酰基辅酶 A 转变成不饱和酰基辅酶 A 的脂肪酸不饱和化反应；泛醇-细胞色素 C 还原酶复合体和 NADH 脱氢酶 1α 参与电子传递和氧化磷酸化反应；微管蛋白在针治治疗过程中表达量升高，也许是因为针刺治疗在整个机体的范围内，提高机体的细胞的生长活性，增强机体的免疫性，通过机体自身的调节来减缓疾病对机体的伤害。这个是与中医理论的整体观是相符合的。

从这些特异性表达基因的组成来看，针治作用的发挥主要是通过细胞物质和能量代谢过程中电子转运，刺激细胞的生长和加强信号传导来实现的。

参考文献：

[1] 何　玲，王瑞辉，张卫华，等. 针刺肝胆经穴对糖尿病大鼠糖代谢的影响与机理研究[J]. 中华中医药学刊，2007，25(1)：95－97.

[2] 林亚平，易受乡，严　洁，等. 电针“内关”对心肌缺血再灌注损伤保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志，2004，10(4)：66－68.

[3] 田庆华，尹　岭，孙锦平. 针刺足三里穴对脑肠肽及胃肠功能的影响[J]. 中国康复理论与实践，2003，9(3)：186－188.

[4] 李昆霖，吴国明，戢福云，等. 人小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达基因的克隆研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(24)：2403－2405.

[5] Diatchenko L，Lau Y F，Campbell A P，*et al*. Suppression subtractive hybridization：a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1996，93(12)：6025－6030.

[6] Li M，Zhang Y. Modulation of gene expression in cholesterol-lowering effect of electroacupuncture at Fenglong acupoint (ST40)：a cDNA microarray study[J]. Int J Mol Med，2007，19(4)：617－629.

[7] Uttamchandani M，Huang X，Chen G Y，*et al*. Application of microarrays in high-throughput enzymatic profiling[J]. Mol Biotechnol，2004，28(3)：227－239.

[8] 王米渠，张卫，李珉，等. 用基因芯片筛选针刺衰老大鼠涌泉穴的 318 个差异基因初报[J]. 中国中西医结合杂志，2002，22(11)：844－847.

[9] Rebrikov D V，Britanova O V，Gurskaya N G，*et al*. Mirror orientation selection (MOS)：a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization[J]. Nucleic Acids Res，2000，28(20)：E90.

[10] Porter T D，Coon M J. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms，substrates，and catalytic and regulatory mechanisms[J]. J Biol Chem，1991，266(21)：13469－13472.

（编辑　张　维）

（上接 1098 页）

主动脉夹层最常见的症状是突然发生的、剧烈的“撕裂样”或“刀割样”前胸部疼痛，通常疼痛可随着夹层沿主动脉走行而扩展。其他与并发症相关的症状可于发病同时或之后出现。包括：①主动脉任一部位外膜的破裂（常破入左胸膜腔或心包腔内）；②血肿在血管壁内延伸阻塞主动脉的主要分支，压迫管腔，可造成心肌梗死（冠状动脉受累）、内脏缺血、肾功能衰竭、肢体无脉症。③扩展到主动脉根部破坏主动脉瓣环造成主动脉返流[1,2]。

临床表现主要依据撕裂的部位而定，头颈部、胸腹部腰背部及四肢均可受累。心血管系统、神经系统、消化系统、呼吸系统等均可出现症状。临床表现易误诊为心绞痛、心肌梗死、胆石症、急性胰腺炎、肠梗阻及坐骨神经痛等[3,4]。

本例始误诊为心肌梗死，在外院给予溶栓、电除颤、抗凝、抗血小板聚集症状无明显缓解。此后反复出现胸闷、气短、发憋，复查心脏彩超考虑腹主动脉夹层，通过腹主动脉 MRI 明确诊断。笔者认为有以下情况时应高度怀疑主动脉夹层：①突发“撕裂样”剧痛或“刀割样”疼痛；②对心电图改变不明显，反复剧痛患者；③复查心脏彩超、CT 或 MRI 明确。④主动脉夹层撕裂后均有心包积液，引起胸腔积液。

关键词：主动脉疾病；心肌梗死；脑梗死
中图法分类号：R543.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Lilly L S. 心血管病理生理学[M]. 李天德，智光译. 人民军医出版社. 2006：88－96.

[2] 陈国伟，郑宗锷. 现代心脏内科学[M]. 长沙：湖南科学技术出版社，1998，1187－1189.

[3] 褚骏仁，杨露芳. 主动脉夹层[M]//陈灏. 实用内科学. 第 11 版. 北京；人民卫生出版社，2001：1501－1503.

[4] 倪　林. 主动脉夹层 4 例报告[J]. 实用全科医学，2006，4(1)：65.

（编辑　王　红）