文章编号:1000-5404(2011)04-0389-03

论著

ptges3a基因在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达

韩勇军,吴新荣 (510010 广州,广州军区广州总医院药剂科)

【摘要】 **目的** 克隆斑马鱼前列腺素E合酶3a(prostaglandin E synthase 3a, ptges3a)基因,研究其在斑马鱼胚胎早期发育中的表达情况。**方法** 提取斑马鱼胚胎的总RNA,制备DIG标记的ptges3a RNA反义探针,整胚原位杂交研究ptges3a在斑马鱼胚胎早期发育过程的表达。**结果** ptges3a在shield期前普遍性表达,10体节期在后脑神经龙骨处有特异性表达,18体节期在后脑有特异性表达,在26 hpf时期头部表达较多,并且在肾小管有特异性表达,36 hpf ptges3a在头部较高表达。**结论** ptges3a可能参与了脑部发育和肾小管形成。

【关键词】 斑马鱼;前列腺素E合成酶;胚胎发育
【中图法分类号】 R321;R345;R394.2 【文献标志码】 A

Expression of ptges3a during early development in zebrafish

Han Yongjun, Wu Xinrong (Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong Province, 510010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To clone prostaglandin E synthase 3a (ptges3a) gene and investigate its temporal and spatial expression pattern in zebrafish during early development. **Methods** The total RNA of different phases of zebrafish embryos was extracted. Digoxin-labeled RNA probe of ptges3a was prepared. Whole embryo mount *in situ* hybridization was employed to investigate the expression pattern of ptges3a during zebrafish embryogenesis. **Results** ptges3a transcript was distributed ubiquitously before shield stage. At 10-somite there were detectable expression of ptges3a gene in the hindbrain neural keel, and at 18-somite it was expressed in the hindbrain. From 26 to 36 h after post fertilization (hpf), high expression of ptges3a was found in the brain. ptges3a was also detectable in the renal tubule at 26 hpf. **Conclusion** The expression pattern of ptges3a during zebrafish embryogenesis suggests that it may be critical for the development of brain and renal tubule. Further investigation on the function of ptges3a is needed.

【**Key words**】 zebrafish; prostaglandin E synthase 3a; embryonic development

Corresponding author: Wu Xinrong, E-mail: gzwxrong@yahoo.com

前列腺素(prostaglandin,PG)E_2是一种重要的前列腺素类物质,参与机体多种生理及病理过程,前列腺素E合成酶(prostaglandin E synthase 3, ptges3)是PGH_2转化为PGE_2过程中的重要终端限速酶。多项研究[1-3]结果显示,ptges3在结肠癌、肺癌、头颈部肿瘤、乳腺癌和胃癌中过表达,且与肿瘤的发生、发展密切相关。缺失ptges3的小鼠可以消除炎症,类似于非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug,NSAID)作用的效果[4],动脉粥样硬化患者的巨噬细胞中ptges3有高表达,可诱导血小板破裂[5]。ptges3可能成为用于治疗疾病和筛选药物的潜在靶点。斑马鱼是近几十年出现的新型模式生物,它有许多优点:个体小、喂养费用便宜;早期胚胎透明,易于观察和操作;产卵多,繁殖周期短。通过序列比对和进化树分析发现斑马鱼ptges3a与小鼠、人的ptges3具有高度同源性。整胚原位杂交技术是研究斑马鱼发育相关基因的功能和表达模式的一种重要手段。本研究通过整胚原位杂交方法分析了ptges3a mRNA在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达情况,为深入研究这一基因的功能提供基础依据。

【通信作者】 吴新荣,E-mail:gzwxrong@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 材料

斑马鱼Tubingen野生型,总RNA提取试剂盒RNAqueous-4PCR Kit(Ambion公司),PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、大肠杆菌DH5α感受态细胞、普通质粒小提取试剂盒(Tiangen公司),T_4 DNA连接酶、pGM-T easy载体、DIG RNA Labeling Mix(Roche公司),SP6 RNA Polymerase(Promega公司),限制性内切酶*Apa* Ⅰ、Ex *Taq*聚合酶(TaKaRA公司),Anti-Digoxigenin-AP、染色剂:NBT和BCIP(Roche公司)。

1.2 方法

1.2.1 人、小鼠和斑马鱼的ptges3基因进化树分析 从生物技术信息网页(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/)获取

人、小鼠的 ptges3 基因和斑马鱼 ptges3a 基因序列，用 CLC Sequence Viewer 6.1 软件进行构建系统进化树。

1.2.2 提取总 RNA 收集 24 hpf 时期的 Tubingen 野生型斑马鱼胚胎，按照 RNAqueous-4PCR Kit 说明进行操作，－70 ℃保存。

1.2.3 RT-PCR 扩增 将提取的总 RNA 用随机引物法进行反转录。根据斑马鱼 ptges3a 基因 mRNA 序列，设计这 2 个基因的引物，ptges3a 上游：5′-TGATGGGTGAACACTGAAAGG-3′，下游 5′-TGGAGGGAGAAGGCAGAATA-3′，PCR 产物大小为 898 bp。内参为 β-actin 上游：5′-GCCGTGACCTGACTGACTACCT-3′，下游 5′-CGCAAGATTCCATACCCAAGA-3′，PCR 产物大小为 273 bp。用 cDNA 模板扩增，琼脂糖凝胶电泳鉴定，用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收扩增的目的基因。

1.2.4 克隆 PCR 产物 将回收纯化的 ptges3a DNA 片段连接到 T easy 载体上[6-7]，42 ℃热激法转化到感受态 DH5α 中，经氨苄抗性筛选重组质粒克隆。

1.2.5 菌落 PCR 鉴定和测序 ①挑取单个菌落进行摇床培养 3 h，以菌液为模板进行 PCR 扩增，凝胶电泳检测是否有目的基因；②将菌落 PCR 鉴定有目的基因的重组质粒送到华大基因公司进行测序。

1.2.6 制备反义 mRNA 探针 将提取纯化的 Ptges3a 重组质粒用 *Nco* Ⅰ酶切线性化，用异丙醇纯化，经体外 SP6 转录体系，同时加入地高辛标记的寡核苷酸，转录得到 DIG- Ptges3a 反义 mRNA 探针，－70℃保存。

1.2.7 斑马鱼整胚原位杂交 收集 Tubingen 野生型斑马鱼胚胎，按照文献[8]实验方法进行杂交，在解剖显微镜白场下观察并拍照。

2 结果

2.1 小鼠、人和斑马鱼 ptges3a 基因同源性分析

根据已报道的斑马鱼 ptges3a 氨基酸与小鼠、人的 ptges3 氨基酸序列，利用 CLC Sequence Viewer 6.1 软件进行构建系统进化树，结果发现斑马鱼的 ptges3a 氨基酸序列与小鼠、人的ptges3 具有高度同源性，表明斑马鱼的 ptges3a 基因功能可能与小鼠、人的相近。见图 1。

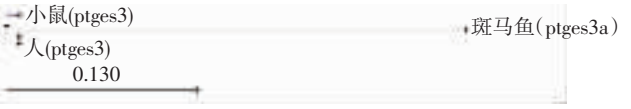
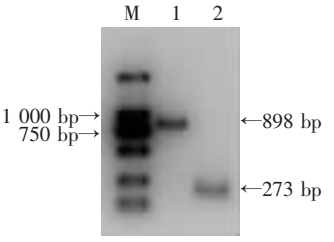


图 1 小鼠、人和斑马鱼 ptges3 基因系统进化树图谱

2.2 凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增的 ptges3a 基因

用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增的 ptges3a DNA 片段，其大小与设计的相符。见图 2。



M：标准(DL 2 000)；1：ptges3a；2：β-actin

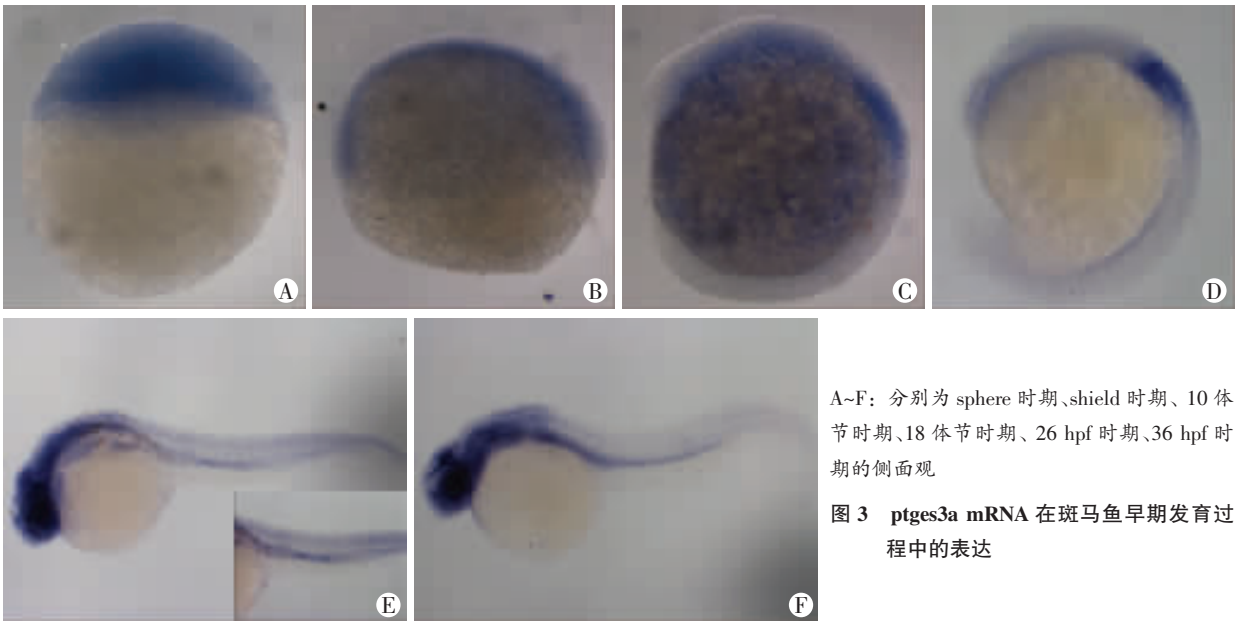
图 2 琼脂糖凝胶电泳鉴定 ptges3a 基因片段结果

2.3 斑马鱼整胚原位杂交

解剖显微镜下观察不同时期胚胎的原位杂交，如图 3 所示，ptges3a 在 shield 期前普遍性表达(图 3A、B)，10 体节期在后脑神经龙骨处有特异性表达(图 3C)，18 体节期，在后脑有特异性表达(图 3D)，在 26 hpf，头部表达较多，并且在肾小管有特异性表达(图 3E)，36 hpf ptges3a 在头部表达均较高表达(图 3F)。

3 讨论

传统的 NSAID 及近些年临床使用的 COX-2 特异性抑制剂都存在心血管方面的不良反应[9-10]，因此需要寻找一条更安全、更理想的干预途径。ptges 作为 PGE_2 合成的终端限速酶，是有效抑制 PGE_2 的分子靶点[11]，通过抑制 ptges 有望避开传统 NSAID 和 COX-2



A~F：分别为 sphere 时期、shield 时期、10 体节时期、18 体节时期、26 hpf 时期、36 hpf 时期的侧面观

图 3 ptges3a mRNA 在斑马鱼早期发育过程中的表达

特异性抑制剂的不良反应[12]，是一个前景良好的、较 COX-2 更理想的肿瘤防治新靶点，可为以 ptges 为靶点的新型抗肿瘤药物及治疗其他疾病的药物开发与应用提供依据[13]。

本研究利用斑马鱼模式生物研究了 ptges3a 在胚胎发育中的表达情况，整胚原位杂交发现，ptges3a 在 shield 期前是普遍性表达，10 体节期在后脑神经龙骨处有特异性表达，18 体节期，在后脑有特异性表达，在 26 hpf，头部表达较多，并且在肾小管有特异性表达，36 hpf ptges3a 在头部表达较高表达，表明 ptges3a 可能在脑部发育和肾小管发育过程中起重要作用。我们通过研究 ptges3a 在斑马鱼胚胎发育过程中的表达，为下一步研究该基因功能提供了一定的实验基础。

参考文献：

[1] Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson P J. Membrane prostaglandin E synthase-1：a novel therapeutic target[J]. Pharmacol Rev, 2007, 59(3)：207－224.
[2] Mehrotra S, Morimiya A, Agarwal B, *et al*. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in breast cancer：a potential target for therapy[J]. J Pathol, 2006, 208(3)：356－363.
[3] Chang S H, Liu C H, Conway R, *et al*. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(2)：591－596.
[4] Trebino C E, Stock J L, Gibbons C P, *et al*. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(15)：9044－9049.
[5] Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, *et al*. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans[J]. Circulation, 2003, 107(11)：1479－1485.
[6] 丁可军，何志旭，舒莉萍，等. pCS^{2+}-FLASH 重组质粒的构建及斑马鱼 FLASH 基因反义 mRNA 探针的制备[J]. 第三军医大学学报，2010，32(10)：1119－1120.
[7] 黄渝侃，张明昌，王勇，等. P27Kip1 基因 shRNA 表达质粒的构建鉴定及功能研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(22)：2148－2151.
[8] Nusslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish：A Practical Approach[M]. New York：Oxford University Press, 2002：261－263.
[9] McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase：a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2[J]. JAMA, 2006, 296(13)：1633－1644.
[10] FitzGerald G A, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2[J]. N Engl J Med, 2001, 345(6)：433－442.
[11] Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway[J]. Prog Lipid Res, 2004, 43(1)：3－35.
[12] Murakami M, Nakashima K, Kamei D, *et al*. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2[J]. J Biol Chem, 2003, 278(39)：37937－37947.
[13] Jakobsson P J, Thoren S, Morgenstern R, *et al*. Identification of human prostaglandin E synthase：a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(13)：7220－7225.

（收稿：2010-09-16 修回：2010-10-29）
（编辑　王小寒）

文章编号：1000-5404(2011)04-0391-01

个案与短篇

以餐后低血糖伴意识障碍为临床表现的胰岛细胞瘤 1 例

董华英，刘彩茹，吴诚义，杨光伦，陈　鑫　（400016 重庆，重庆医科大学附属第一医院内分泌外科）

【关键词】 低血糖；意识障碍；胰岛素瘤
【中图法分类号】 R736.7　【文献标志码】 B

1　临床资料

患者，男性，30 岁。因“反复晕厥 1 年”入院。1 年前患者于饥饿时出现心悸、大汗、四肢无力，严重时出现手足抽搐，意识障碍，无双目凝视，无口吐白沫及大小便失禁，多发生于餐后 3～4 h。当地医院多次监测血糖均在 2.1 mmol/L 左右，最低值为 1.7 mmol/L，上述低血糖症状在进食或口服葡萄糖可缓解，行胸片、B 超、CT 及脑电图等检查，均未发现异常。为求进一步诊治，患者于 2010 年 11 月 2 日到我院内分泌科住院治疗。患者自发病以来精神较差、反应迟钝、听力及视力下降，无手足麻木，胃纳可，体质量无明显变化。入院查体无阳性发现。实验室检查：肝功能、乙肝 5 项、肾功能、电解质、凝血象、大小便常规、血脂、ACTH、皮质醇和甲功全项无异常。腹部 B 超未见异常。腹部 CT 示：胰尾钙化结节，增强后明显强化，考虑肿瘤，胰岛细胞瘤可能性大（图 1）。多次监测血糖波动在 1.9～3.6 mmol/L 之间，空腹胰岛素为 32.25 U/ml，胰岛素释放指数均大于 0.4。患者具有典型的 Whipple 三联征，考虑胰岛 B 细胞瘤，转入我科行手术治疗。于 2010 年 11 月 10 日在全麻下行胰尾部胰岛细胞瘤切除术。术中于胰尾部前方及脾门处扪及一约 2 cm×2 cm 质硬包块，分离肿块周围组织并完整切除，术中冰冻病检示胰岛细胞瘤。切除肿瘤后 15 min 后血糖回升。石蜡确诊结果为：胰岛细胞瘤，考虑生长抑素瘤，局部包膜受累及；免疫组化：CgA（+）、Syn（+）（图 2）。术后检测血糖未出现低血糖。

2　讨论

胰腺内分泌肿瘤，是由胰岛中的某一种细胞为主所形成的肿瘤，目前有 8 种以上，并产生相应的临床综合症。然而，实际上许多肿瘤是混合型，分泌多种激素，但以其中某一种为主，其

（下转 395 页）

【通信作者】 吴诚义，电话：(023)89011192，E-mail：chengyiw@126.com