基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0970-04

SEDL 基因及其编码蛋白 sedlin 在小鼠多种组织中表达研究

胡 娜[1],熊 丰[1],廖 飞[2],王旭荣[1]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院内分泌科,重庆 400014;2. 重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 SEDL 基因及其编码蛋白 sedlin 在小鼠多种组织中的表达。方法:采用 Real-Time PCR 和 Western Blot 检测小鼠 9 种组织中 SEDL 基因和 sedlin 蛋白表达水平及 1、2、4 周龄小鼠骨组织中的 SEDL 基因及 sedlin 蛋白表达水平。结果:①所检测小鼠 9 种组织中均有 SEDL 基因及对应的 sedlin 蛋白表达。组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白表达量上有统计学差异($P<0.000\,1$),以骨组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白表达水平高。②不同周龄小鼠骨组织中,SEDL 基因及 sedlin 蛋白的相对表达水平有统计学差异($P<0.01$),二者的表达量随年龄变化的趋势相吻合。结论:SEDL 基因和 sedlin 蛋白在所测组织中的表达相一致。二者的表达量在组织间均有差异性,其中以骨组织中表达水平最高。小鼠骨组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白的表达量上有相同时相性改变。

【关键词】SEDL 基因;Sedlin;脊椎骨骺发育不良

【中国图书分类法分类号】R394.2;R681.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-18

Expressions of SEDL gene and its encoded protein sedlin in a variety of tissues in mice

HU Na, et al

(*Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of SEDL(X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SEDL) gene and its encoded protein sedlin in a variety of tissues in mice. *Methods*: Real-Time PCR and Western Blot were used to detect the expression levels of the SEDL mRNA and sedlin protein in 9 tissues in mice, respectively. And the expression levels of them in bone tissues in mice of 1, 2 and 4-week-old were also measured in the same way. *Results*: ①Expressions of SEDL gene and its corresponding sedlin protein were existed in 9 tissues detected in mice. The relative expression levels of SEDL mRNA and sedlin protein in tissues in mice were significantly different ($P<0.0001$), and with a high level in bone. ②In bone tissues of age varied mice, the relative expression levels of SEDL gene and sedlin were obviously different ($P<0.01$), and age-related changes in expressions were identical with each other. *Conclusion*: It was concluded that expressions of SEDL gene and sedlin were consistent in tested tissues. Expression levels of them were different among tissues and with a high level in bone. In bone tissues of mice, the expressions of SEDL gene and sedlin had the same changes with time.

【Key words】SEDL gene; Sedlin; Spondyloepiphyseal dysplasia tarda

X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良(X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SEDL)是一种罕见的遗传性骨病。SEDL 患者多在儿童早中期出现生长发育迟缓,主要表现为脊椎骨骺发育障碍,而全身其他组织器官结构和功能未见异常[1]。目前已明确 SEDL 发生与位于 Xp22.2 上的 SEDL 基因突变后其蛋白产物 sedlin 功能缺陷有关[2]。迄今为止,关于 SEDL 的发病机制及 sedlin 的功能仍不清楚。已发现 SEDL 基因及其蛋白产物在进化中高度保守,SEDL 基因 mRNA 在人体多种组织中都有表达[3,4];sedlin 蛋白可能参与内质网到高尔基体的囊泡运输[5,6]。

作者简介:胡 娜(1982-),女,硕士,研究方向:小儿内分泌疾病。

通讯作者:熊 丰,女,教授,E-mail:xiongfengw@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市自然科学基金计划重点项目(编号:CSTC,2007BA5028)。

目前关于 SEDL 基因 mRNA 表达研究与 SEDL 疾病的临床现象存在 2 种难以解释的现象:①SEDL 基因 mRNA 泛在性表达,但 SEDL 基因突变导致 sedlin 蛋白功能缺失后只表现为骨骼组织生长异常,而其他组织器官未见异常,这种组织特异性病理现象至今不清楚其原因。②有报道称 SEDL 基因 mRNA 在胎儿时期的某些组织中可检测到[4],但 SEDL 患者在出生时生长发育正常,直至儿童早期才出现骨骼生长异常,sedlin 蛋白在骨骼组织中的表达是否存在时相性,目前尚未见报道。SEDL 基因属于结构基因,其主要生物学作用应该是通过其表达产物 sedlin 来实现。基因表达生成蛋白质是非常复杂的过程,翻译是其中一个重要的调控环节。目前尚未确认 sedlin 蛋白是否在组织中泛在表达成蛋白质以及蛋白是否存在表达时相性。小鼠 sedlin 蛋白和人 sedlin 蛋白同

源性最高,本研究检测小鼠体内 9 种主要组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白的表达,以及在小鼠 3 个不同发育阶段的骨组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白的表达情况。旨在探索 SEDL 基因突变后骨骼的选择性病理变化和 sedlin 蛋白在组织表达的联系,以及蛋白表达是否存在时相性特点,为进一步研究 sedlin 蛋白的功能及 SEDL 发生机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 Bal b/c 小鼠,分别选取 1 周龄、2 周龄、4 周龄小鼠各 20 只,1 周龄小鼠平均体质量 4.5 g,2 周龄小鼠平均体质量 7.6 g,4 周龄小鼠平均体质量 16.2 g。将其处死后,分别取 1 周龄小鼠脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、脾脏、皮肤、骨骼肌和骨组织(下肢胫骨骨干)9 种组织,分别取 2 周龄、4 周龄小鼠骨组织(下肢胫骨骨干),-80℃冻存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 总 RNA 提取试剂盒购于 Bioteke 公司;蛋白质提取试剂盒购于 KeyGEN 公司;逆转录试剂盒、SYBR Green Ⅰ Real-time PCR 试剂盒均购于 TaKaRa 公司;兔来源 sedlin 多克隆抗体购于 Proteintech 公司;β-Actin 小鼠单抗购于美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购于美国 Santa Cruz 公司;蛋白分子量标准购于 Fermentas 公司;化学发光试剂盒购于 Bioworlde 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购于美国 BIO-RAD 公司;主要仪器有岛津公司紫外可分光光度计,BIO-RAD Western blot 半干转膜系统,美国 ABI 公司 StepOne 实时荧光定量 PCR 系统等。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的采集 随机选取 1 周龄、2 周龄、4 周龄 Bal b/c 小鼠各 20 只,予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,用清洁手术器械打开小鼠胸腔,暴露心脏后由心尖处进针,剪开左心耳用生理盐水通过左心室-升主动脉来灌洗。灌洗后于冰上操作,依次迅速取下 1 周龄小鼠心脏、肝脏、肺脏、肾脏、脾脏、脑,皮肤、骨骼肌和下肢胫骨 9 种组织以及 2 周龄、4 周龄小鼠的下肢胫骨。其中取下肢胫骨骨干时,剔除骨膜及两端软骨部分,并用蒸馏水反复冲洗骨髓腔,将残留血液冲洗干净。其余各种组织用蒸馏水冲洗残留血液后,分别迅速冻存于 2 ml 的 Eppendorf 管,按不同组织和年龄标记后置于冻存盒中。-80℃冰箱中保存备用。

1.2.2 总 RNA 和蛋白质的提取 分别称取上述不同的组织标本 10~100 mg,按照试剂盒说明在无 RNA 酶环境下,冰上低温操作提取总 RNA 和总蛋白。其中,提取下肢胫骨标本总 RNA 和蛋白时,用清洁研钵器在低温下反复研钵至糊状后再收集悬液进行后续步骤,其他各组织匀浆处理;紫外分光光度计检测其纯度和浓度;BCA 蛋白定量方法对提取的总蛋白进行定量;为防止 RNA 和蛋白降解,提取总 RNA 后尽快将其逆转录成 cDNA,-20℃保存;提取的总蛋白置于 -80℃保存。

1.2.3 引物的设计 根据 GenBank 提供的 mRNA 基因序列设计 Real-time PCR 引物,由上海鼎安生物科技有限公司合成。β-Actin 引物上游序列为:5'-CACACCCGCCACCAGTTCG-3',下游序列为:5'-GTCCTTCTGACCCATTCCCACC-3',产物长度为 174 bp;SEDL 引物上游序列为:5'-TGGGAAAGCAGAATCCAAAGA-3',下游序列为:5'-GCAGTGACAAAGGCTGATACAAA-3',产物长度为 159 bp;

1.2.4 RNA 反转录和 Real-time PCR 采用合格的 RNA 标本,将所提取的总 RNA 按照逆转录试剂盒说明进行逆转录合成 cDNA。总体系为 20 μl,按所测不同组织总 RNA 的浓度分别计算所加总 RNA 的量。反转录反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,完成反应后所得 cDNA 置于 -20℃保存。验证 SEDL、β-Actin 的扩增效率后,按照试剂盒说明分别将不同标本的 cDNA 加入到 Real-time PCR 反应体系中,每份标本设三个重复,同一份标本的 SEDL 基因及 β-Actin 内参基因的检测在不同管中进行,总体系为 10 μl,按以下反应条件进行:95℃ 2 min;95℃ 15 s,61℃ 1 min,95℃ 15 s,共 40 个循环,扩增完成后进行熔解曲线分析,得到扩增曲线、熔解曲线并记录 Ct 值。

本实验以 1 周龄 Bal b/c 小鼠骨骼肌中 SEDL 基因的表达水平为参照因子,采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法对 SEDL 基因进行相对定量。SEDL 基因转录产物丰度用其与 β-Actin 基因表达量校正成相对丰度。

1.2.5 Western blot 将提取的不同组织标本的总蛋白,进行考马斯亮蓝染色,验证蛋白提取成功后,按不同组织标本所测的总蛋白的浓度计算所加入的总蛋白量,浓度高的蛋白样品用蒸馏水稀释处理,使各组标本相同上样量中所含蛋白的量保持一致。取 20 μl 稀释处理后的总蛋白样品上样到 15% SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白电泳。电泳结束后,用半干转膜法将 sedlin 蛋白和 β-Actin 分别转到不同的 PVDF 膜上,室温下用封闭液摇床封闭 1 h 后,用抗 sedlin 和 β-Actin 的抗体(sedlin:1:1 200;β-Actin:1:4 000)4℃孵育过夜,相继用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(sedlin:1:2 000;β-Actin:1:5 000)室温孵育,化学发光曝光成像,凝胶成像后行灰度扫描分析。Western Blot 灰度值单位用 AU(Arbitary units)表示,经过 β-Actin 校正后,对 sedlin 蛋白的表达水平进行半定量分析。

1.3 统计学处理

所有实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS8.2 统计软件进行秩和检验和多个独立样本两两比较 Nemenyi 法检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Real-time PCR 检测 SEDL 基因在小鼠多种组织中相对表达水平

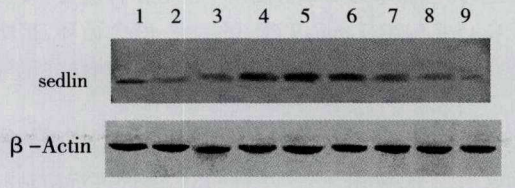
2.1.1 SEDL 基因在小鼠 9 种组织中的表达 结果发现,在 1 周龄小鼠 9 种主要组织中 SEDL 基因都有转录,但转录活性有质的差异($P < 0.000\ 1$)。在所检测小鼠的 9 种组织中,不

同组织中 SEDL 基因表达水平两两比较，结果有统计学差异（$P<0.05$）。SEDL 基因在骨骼组织表达丰度最高，在肝脏和骨骼肌也有明显表达，但在肺脏、心脏、脑、皮肤、脾脏、肾脏等组织表达的相对丰度不到骨骼组织的 0.1%（表 1）。因此，可认为 SEDL 基因存在明显的组织特异性高转录。

2.1.2　SEDL 基因在不同周龄小鼠骨组织中的表达　在小鼠 3 个不同周龄的骨组织中均有 SEDL 基因的表达，SEDL 基因在 1 周龄、2 周龄、4 周龄 3 个不同年龄点的小鼠骨组织中相对表达水平有统计学差异（$P<0.01$）（表 2）。对 3 个周龄小鼠骨组织中 SEDL 基因表达水平进行两两比较，结果有统计学差异（$P<0.05$）。其中，1 周龄小鼠骨组织中 SEDL 基因的相对表达水平最高，2 周龄其相对表达水平开始明显下降，4 周龄小鼠骨组织中 SEDL 基因的相对表达水平又开始增加。

2.2　Western blot 检测 sedlin 蛋白在小鼠多种组织中的表达

2.2.1　sedlin 在小鼠 9 种组织中的表达　1 周龄小鼠 9 种组织中都可检测到 sedlin 和 β-Actin（图 1），用相对于 β-Actin 的灰度进行半定量分析，小鼠组织中 sedlin 表达水平有统计学差异（$P<0.0001$）。不同组织中 sedlin 蛋白相对表达水平两两比较，结果有统计学差异（$P<0.05$）。其中，sedlin 在脑、骨骼肌、骨组织、脾脏、肺脏、肝脏等相对含量较高，在皮肤、心脏和肾脏等较低（图 2）。



1. 脾；2. 心；3. 皮肤；4. 骨；5. 脑；6. 骨骼肌；7. 肺；8. 肝；9. 肾

图 1　小鼠 9 种组织中 sedlin 和 β-Actin 的 Western Blot 结果

表 1　SEDL 基因 mRNA 在小鼠 9 种组织中的相对表达水平（$\bar{x}\pm s$）

组织（1 周龄小鼠）	例数（n）	SEDL
肾脏	9	0.02 ± 0.01
脾脏	9	0.04 ± 0.03
皮肤	12	0.05 ± 0.04
脑	9	0.05 ± 0.05
心脏	9	0.06 ± 0.02
肺脏	9	0.08 ± 0.02
骨骼肌	12	1.22 ± 0.32
肝脏	9	5.21 ± 2.41
骨组织	9	154.06 ± 31.43

$P<0.000\,1$，各种组织中 SEDL 基因表达水平比较差异有统计学意义

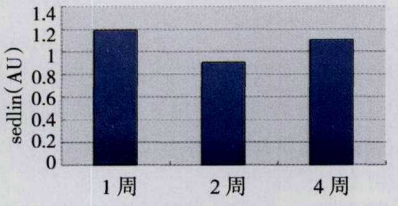


图 4　3 个不同周龄小鼠的骨组织中 sedlin 蛋白的表达水平

3　讨　论

SEDL 的发病与 SEDL 基因突变后所编码的蛋白产物 sedlin 功能缺陷有关。已有的研究证实 SEDL 基因在多种组织中有表达。但 SEDL 患者只有骨骼明显受累的表现，而全身其他的组织器官未见异常。分析这一现象是否有可能存在 SEDL 基因的表达与 sedlin 蛋白的翻译脱节？或存在选择性翻译？组织中泛在性表达的 SEDL 基因未能全部翻译成有活性的 sedlin 蛋白。本文结果表明，SEDL 基因在所检测组织都有转录，并有对应蛋白质 sedlin 表达，证实了基因和蛋白在组织中的表达是一致的，不存在脱节情况。我们的研究还显示组织中 SEDL 基因和 sedlin 的表达水平上均有统计学差异，其中骨组织中 SEDL 基因表达水平远高于其他组织，相对 sedlin 蛋白表达水平也高。结合之前国外的研究结论，sedlin 可能参与物质从内质网到高尔基体间的囊泡运输[5,6]，那么它在不同组织细胞中所运输的可能是一类具有某些相

2.2.2　sedlin 在不同周龄小鼠骨组织中的表达　3 个不同周龄小鼠骨组织中都可检测到 sedlin 和 β-Actin（图 3），sedlin 蛋白在不同周龄小鼠的骨组织中表达水平有统计学差异（$P<0.01$）（图 4）。对 3 个周龄小鼠骨组织中 sedlin 蛋白表达水平进行两两比较，结果有统计学差异（$P<0.05$）。其中，不同周龄小鼠骨组织中 sedlin 蛋白相对表达水平的变化趋势与 SEDL 基因相吻合，呈现出 1 周龄小鼠骨组织中 sedlin 相对表达水平最高，2 周龄其水平较 1 周龄下降，4 周龄又出现较高表达水平。

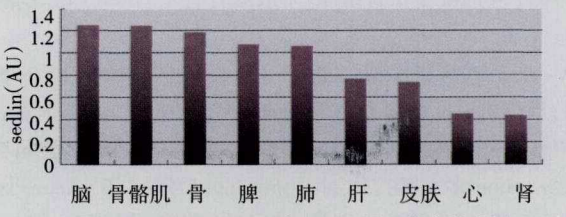


图 2　小鼠 9 种组织中 sedlin 蛋白的表达水平

表 2　SEDL 基因 mRNA 在 3 个不同周龄的小鼠骨组织中的相对表达水平（$\bar{x}\pm s$）

周龄	例数（n）	SEDL
1 周龄骨组织	9	154.06 ± 31.43
2 周龄骨组织	9	0.45 ± 0.33
4 周龄骨组织	9	1.52 ± 0.09

$P<0.01$，不同周龄小鼠骨组织中 SEDL 基因表达水平比较差异有统计学意义

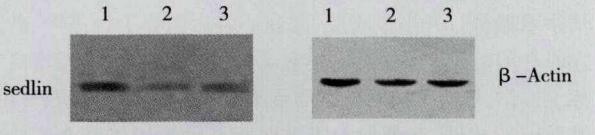


图 3　3 个不同周龄小鼠骨组织中 sedlin 和 β-Actin 的 Western Blot 结果

似特征的成分，这些成分在其他组织细胞中发挥着某些对细胞生长的作用可能是非必须的，或存在其替代成分。然而，对于骨骼组织细胞而言，sedlin 所转运的这类成分的作用对于骨细胞的正常生长发育却是必不可少的，sedlin 在骨骼组织中所转运的特殊成分可能正是参与骨骼生长发育调控的某些信号通路中的关键成分，是骨骼正常生长所依赖的途径。

我们的结果也出现了基因表达量低而 sedlin 蛋白表达量较高的现象，如脑组织 sedlin 蛋白表达量高于骨组织。可能的原因为特定基因的 mRNA 丰度不一定与其翻译产物蛋白质的表达量成线性关系，因为基因表达的调控层次很多，转录水平的调控只是一个环节，转录后调控和翻译及翻译后调控都对于最后蛋白的表达量起作用。再有 mRNA 的降解、蛋白的降解、修饰折叠等因素都可能导致 mRNA 丰度与蛋白表达水平不一致。此外，由于骨组织中无机盐和钙化成分比例大这种特殊性，骨组织中的可溶性蛋白的相对量会远低于其他组织如脑组织等。

此外，有研究报道，胎儿时期的组织中就可检测到 SEDL 基因的 mRNA，但 SEDL 患者在出生时生长发育正常，直至儿童早期才出现可观察的骨骼生长异常。可能存在以下情况：SEDL 基因及 sedlin 蛋白在骨组织中的表达存在时相性，sedlin 蛋白的表达水平可能与人的不同发育阶段是相适应的。因此，如果 sedlin 蛋白在骨组织中的表达存在时相性特点，这就为解释 SEDL 骨骼临床特征出现的时间以及探索 sedlin 在骨骼组织中信号通路的作用方式提供了线索。SEDL 疾病出现骨骼改变多在儿童早中期，1 周龄小鼠发育水平相当于人类婴儿期，2 周龄小鼠发育水平相当于幼儿期，4 周龄小鼠发育水平相当于人类儿童期。因此，我们通过选择研究这 3 个不同年龄阶段的小鼠骨组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白的表达，明确 SEDL 基因及 sedlin 蛋白在骨组织中表达是否存在时相性，在不同发育阶段有无表达量上的变化。研究发现，SEDL 基因及 sedlin 蛋白在不同年龄阶段的小鼠骨组织中相对表达水平均有统计学差异，在相当于人类婴儿期的阶段，均表现出很高水平，幼儿期表达水平开始下降，儿童期阶段又出现较高水平。二者表达量随时间变化的趋势是相吻合的。研究提示骨组织中 SEDL 基因及 sedlin 蛋白表达量上确实存在时相性特征，结合 SEDL 疾病出现骨骼改变的时期加以分析，推测 sedlin 蛋白在婴儿期对骨骼生长发育的信号调控通路可能存在其替代调控途径，因此，SEDL 患者在婴幼儿时期生长发育正常，未出现骨骼改变。儿童阶段，sedlin 蛋白的表达水平较之前开始增加，取代其替代途径开始发挥对骨骼生长发育的调控作用，因此，SEDL 基因突变 sedlin 蛋白功能缺失后在儿童早中期才出现骨骼病变。

综上所述，明确 SEDL 基因及 sedlin 蛋白在组织中的真实表达情况：SEDL 基因所表达的 sedlin 蛋白在组织中是否泛在性表达以及其在骨组织不同发育阶段表达变化情况，对探讨 SEDL 发生的分子机制有帮助。为我们今后深入的研究 sedlin 蛋白的功能及其在骨生长发育信号通路中的作用提供帮助。

参 考 文 献

[1] Savarirayan R, Thompson E, Gécz J. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDL, MIM#313400)[J]. Eur J Hum Genet, 2003, 11(9): 639-642.

[2] Xiong F, Gao J, Li J, et al. Noncanonical and canonical splice sites: a novel mutation at the rare noncanonical splice-donor cut site (IVS4+1A>G) of SEDL causes variable splicing isoforms in X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda[J]. Eur J Hum Genet, 2009, 17(4): 510-516.

[3] Gecz J, Hillman M A, Gedeon A K, et al. Gene structure and expression study of the SEDL gene for spondyloepiphyseal dysplasia tarda[J]. Genomics, 2000, 69(2): 242-251.

[4] Gedeon A K, Colley A, Jamieson R, et al. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. Nat Genet, 1999, 22(4): 400-404.

[5] Gecz J, Shaw M A, Bellon J R, et al. Human wild-type SEDL protein functionally complements yeast Trs20p but some naturally occurring SEDL mutants do not[J]. Gene, 2003, 320: 137-144.

[6] Kümmel D, Müller J J, Roske Y, et al. The structure of the TRAPP subunit TPC6 suggests a model for a TRAPP subcomplex[J]. EMBO Rep, 2005, 6(8): 787-793.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132