基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0332-03

鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子小鼠体内的表达分析

王增产,张小花,万 涛,王李英,刘 湘,汤 华
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分析鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子(Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor, AZI)在小鼠体内的表达情况。方法:RT-PCR,Northern blot,免疫组化染色。结果:RT-PCR,Northern blot 揭示 AZT 基因(Oazin)的表达是全身性的,即各器官都表达。特别是脑,心,肾脏,肌肉,胸腺,睾丸。免疫组化染色显示 AZT 蛋白在心瓣膜细胞,肾小管周围的间质细胞以及肝细胞的间质细胞中高表达。结论:用 RT-PCR,Northern blot 以及免疫组化染色法揭示了 AZT 在 RNA 和蛋白水平小鼠体内中的表达情况。

【关键词】鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子;表达
【中国图书分类法分类号】Q812 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-27

Analysis of the expression of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in mouse tissues

WANG Zeng-chan, et al
(*Key Laboratory of Molecular Infectious Diseases, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Analysis of the expression of Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in mouse tissues. *Methods*: RT-PCR, Northern blot, immunostaining. *Results*: RT-PCR, Northern blot reveal that the expression of Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor gene (AZI) is ubiquitous, especially high in brain, heart, kidney, muscle, thymus and testis. Immunostaining reveals that AZI expresses on valve cells in heart, mesenchyme cells in kidney and liver. *Conclusion*: The expression of AZI in mouse tissues was identified by using RT-PCR, Northern blot and immunostaining.

【Key words】Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor (AZI); Expression

多胺类,包括亚精胺(Spermidine)、精胺(Spermine)和腐胺(Putrescine),是一类能在细胞生理许多方面起重要作用广泛存在的带正电荷小分子,它们是哺乳类细胞生长发育的必需成分,当细胞缺乏多胺类时,会停止生长和增生但不死亡。在细胞中,多胺类能与带有负电荷基团的分子如 DNA,RNA,蛋白质和磷脂发生静电作用[1]。许多研究证明多胺类浓度与肿瘤的形成有着密切相关。在癌症细胞和组织中,多胺水平很高,多胺的合成代谢旺盛,已经展开了设计制作多胺的合成代谢的抑制因子和多胺拮抗剂,来限制肿瘤和癌症细胞的生长。多胺类的生物合成途径成为癌症的化学预防和化学治疗试剂设计的目标[2]。

鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase,ODC)是多胺类生物合成的关键酶之一,ODC 催化细胞内多胺类生物合成的第一步,即催化鸟氨酸形成腐胺[3]。

作者介绍:王增产(1953-),男,实验技师,研究方向:发育遗传学。
通讯作者:汤 华,男,研究员,E-mail:tanghua86162003@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30671080);重庆市科委项目(编号:CSTC,2008 BB5237)。

哺乳类如小鼠,大鼠,人类,牛,ODC 基因的完整结构和序列已被探明。所有哺乳类 ODC 基因都具有 12 个外显子,11 个内含子,外显子-内含子边界位点也都相同。ODC 与肿瘤的形成的相互关系已进行了许多实验研究,ODC 过度表达和提高多胺类浓度或与其它癌症基因共同作用,能在体外使细胞癌变;ODC 高表达转基因鼠的皮肤在致癌剂或紫外线的刺激下更容易形成肿瘤[4]。ODC 的不可逆抑制因子 DFMO 现在被用于临床试验来化学预防多种类型的癌症。

ODC 的活力受到多层次包括转录,翻译和蛋白分解的高度调节[5],ODC 的主要调节因子是鸟氨酸脱羧酶抗酶(Ornithine decarboxylase antizyme,AZ)[6,7]。AZ 能与 ODC 结合,抑制 ODC 的催化活性,是 ODC 酶的抑制蛋白,更重要的是 AZ 与 ODC 的结合,能激活 26S 蛋白分解体(Proteasome)对 ODC 的降解反应。另一个 ODC 的调节因子是鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子(Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor,AZI),AZI 与 ODC 结构有一部分相似,但 AZI 不具有催化活性,AZI,ODC 与 AZ 之间发生竞争结合,而且 AZI 与 AZ 的亲和力强于 ODC 与 AZ 的亲和力,AZI 能把 ODC 从 AZ 的结合中解救出来,减弱 AZ 对 ODC 催化活性的抑制[8]。AZI 能对 ODC 的

催化活性起稳定作用。这些结果都来自体外实验,AZI 的确切功能—体内实验结果至今还没报道。这里,我们确立了 AZI 小鼠体内中的表达模式,为进一步解析 AZI 的体内功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J 小鼠和 AZI 基因捕获(Gene trapped)小鼠(日本熊本大学发生医学研究中心提供)[9]。

1.2 RT-PCR

从成鼠(3 周龄)脑中提取 RNA,纯化,经 DNA 酶处理,进行反转录,合成 cDNA,RNA 酶处理。AZI 的引物为 5'-TGCTCTTCTCATCCTTCTCG-3' 和 5'-TGAATGCCAGATC-CTTCAGG-3'。GAPDH 的引物为:5'-GGAAAGCTGTG-GCGTGATG-3'和 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3'。反应条件为 94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,30 循环。PCR 产物通过 1%琼脂凝胶电泳并用溴化乙锭染色。

1.3 Northern blot

各组织的全 RNA 被提取纯化,用 1%甲醛琼脂凝胶电泳,转到尼龙膜上。AZI 的 RT-PCR 产物被克隆并反转录成地高辛标记的 RNA 探针,与尼龙膜上的 RNA 杂交。地高辛—辣根氧化酶偶联抗体,氧化底物检测信号。

1.4 免疫组化染色

AZI 捕获小鼠 E19.5 胚胎各器官用甲醛固定,石蜡包埋切片,用 X-gal 单抗染色,DAB 显色。

2 结 果

2.1 AZI 全身性地表达在成熟小鼠各组织中

为了了解 AZI 的表达,成熟小鼠的各组织的全 RNA 被提取和纯化,用一部分片段 AZI 的 RNA 探针与各组织的全 RNA 杂交,各组织都出现两条带,分别为 4.4 kb 和 2.37 kb(图 1)。说明 AZI 基因全身性地表达在成熟小鼠各组织中。

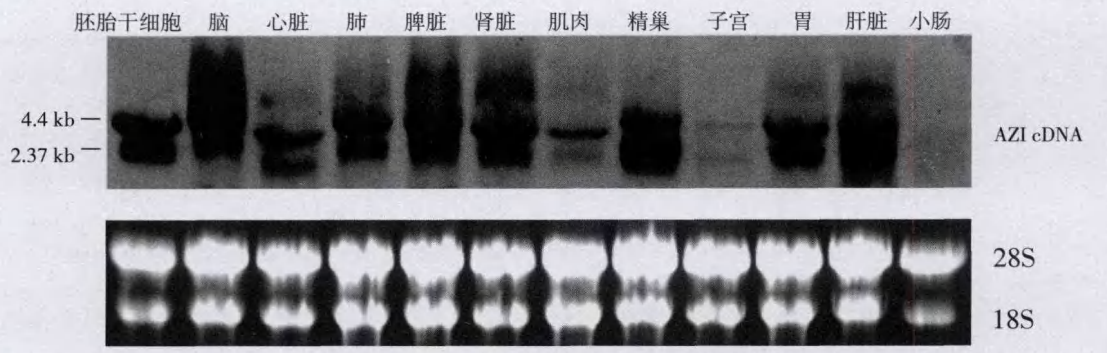
进一步通过 RT-PCR 法确认 AZI 的表达情况,成鼠各组织的 RNA 被反转录成 cDNA,用 AZI 基因的特定引物进行 PCR,像 Northern 结果一样,各组织都表达 AZI 基因(图 2)。脑、心、肾脏、肌肉、胸腺、精巢等显示出高表达。

2.2 AZI 在蛋白水平的表达

AZI 基因捕获小鼠体内含有 X-gal 报告基因,AZI 与 X-gal 能形成融合蛋白,所以 X-gal 的表达与 AZI 的表达在 AZI 基因捕获小鼠体内是一致的[10]。用抗 X-gal 的免疫组化染色即能分析 AZI 在蛋白水平的表达。E19.5 胚胎各组织切片用来做 X-gal 的免疫组化染色,结果揭示出 AZI 在胚胎 E19.5 时期表达在心瓣膜细胞,肾小管周围的间质细胞以及肝细胞的间质细胞(图 3)。

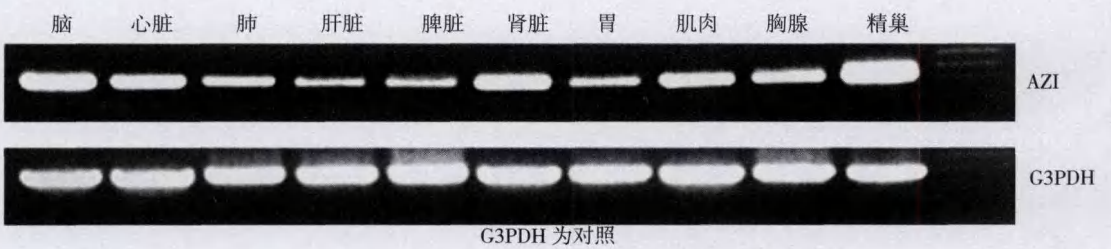
3 讨 论

小鼠的 AZI 蛋白首先由 Fujita 等人在 1982 年从肝脏提取物中分离[11],但它在小鼠的表达模式还没有完整的报道过,我们用分子生物学方法分析了该基因的表达情况,揭示



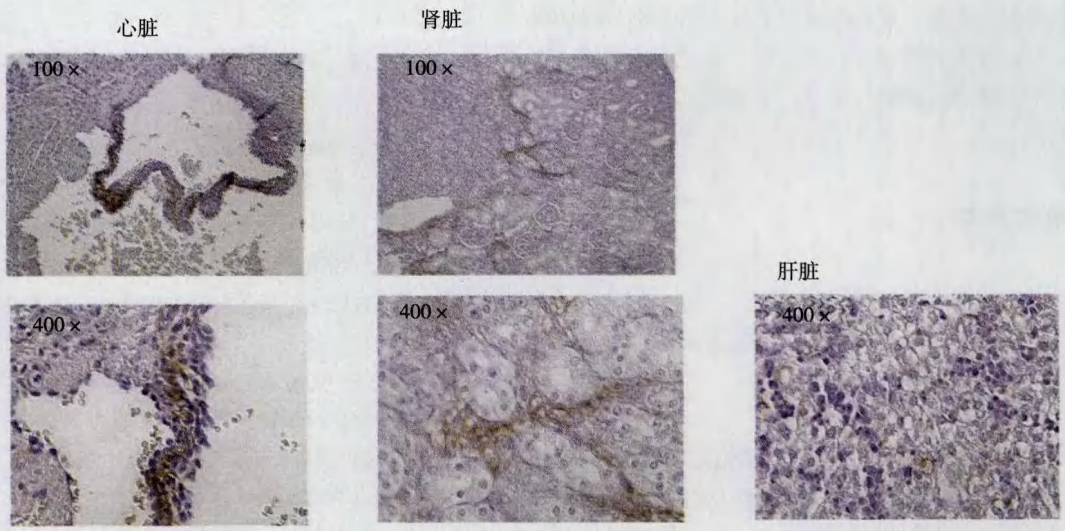
AZIcDNA 片段作为探针,18S 和 28S RNA 作为对照

图 1 Northern blotting 检测 AZI 的 RNA 在小鼠各器官的表达



G3PDH 为对照

图 2 RT-PCR 检测 AZI 的 RNA 在小鼠各器官的表达



棕色为阳性染色

图 3 免疫组化染色分析 AZI 在小鼠胚胎的表达

了它在成鼠时期是全身性的表达，这与该基因参与细胞生长分化的功能是一致的。

基因捕获小鼠由于有 X-gal 报告基因，只要是被捕获的基因都能通过对 X-gal 报告基因的分析来检测捕获的基因在细胞水平的表达。可以克服必须用抗体来检测该蛋白的表达的局限，有时一些基因的抗体还没被制作出来，而基因捕获小鼠能为分析各种基因的蛋白表达提供了简单快捷的研究材料。

解析基因的功能，首先要分析基因在活体动物中的表达模式，才能有针对性地解析基因敲除或转基因小鼠的某些脏器的变异或机能变化。我们的结果证明 AZI 在小鼠体内是全身性地表达，显示 AZI 是生物发育必需的基因，为进一步解析 AZI 基因功能指明了方向。

（致谢：感谢日本熊本大学发生医学研究中心山村研一教授提供 AZI 基因捕获小鼠。）

参 考 文 献

[1] Feuerstein B G, Pattabiraman N, Marton L J. Molecular mechanics of the interaction of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(5):1271-1282.

[2] Meyskens F L, Gerner E W.Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent[J].Clin Cancer Res, 1999, 5(5): 945-951.

[3] Pegg A E, McGill S. Decarboxylation of ornithine and lysine in rat tissues[J]. Biochem Biophys Acta, 1979, 568(2):416-427.

[4] Ahmad N, Gilliam A C, Katiy S K, et al. A definitive role of ornithine decarboxylase in photocarcinogenesis[J]. Am J Pathol, 2001, 159 (3):885-892.

[5] Pegg A E, Shantz L M, Coleman C S. Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation[J]. Biochem Soc Transact, 1995, 22(4):846-852.

[6] Ivanov I P, Murakami Y, Gesteland, et al. Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals [J]. EMBO J, 2000, 19(8):1907-1917.

[7] Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(3):188-194.

[8] Kitani T, Fujisawa H. Purification and characterization of antizyme inhibitor of ornithine decarboxylase from rat liver[J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 991(1):44-49.

[9] 刘 湘，汤 华，唐任宽，等. 用基因捕获法制作鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子基因敲出小鼠[J]. 医学分子生物学杂志，2005，2(1):10-12.

[10] Voss A K, Thomas T, Gruss P. Efficiency assessment of the gene trap approach[J]. Dev Dyn, 1998, 212(2):171-180.

[11] Fujita K, Murakami Y, Hayashi S. A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase[J]. Biochem J, 1982, 204(3):647-652.

（责任编辑：关蕴良）