DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.010
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0025-04

论著

新生大鼠脊髓损伤修复差异表达基因的筛选

马海涵[1],廖维宏[1],伍亚民[1],初同伟[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨新生大鼠半横切后再生时运动皮层神经元基因表达变化及其机制。方法 新生大鼠脊髓单侧横断后即刻局部接受胚胎脊髓移植,术后3 d用抑制性消减杂交技术筛选大鼠双侧运动皮层神经元差异表达基因,构建差减cDNA文库,通过蓝白斑实验和RNA斑点杂交验证差异表达基因真阳性克隆,测序分析。结果 在Genbank中检索出11个上调表达的基因分别与11个不同的蛋白基因有明显同源性,7个下调表达的基因分别与7个不同的蛋白基因有明显同源性。结论 新生大鼠运动皮层神经元轴突中断后的再生过程中有基因表达变化,变化基因可能与神经元再生及轴突延长有关。

关键词:胚胎脊髓移植;运动皮层神经元;差异表达基因;抑制性消减杂交
中图法分类号:Q781;R322.81;R364.33 文献标识码:A

Screening of differentially expressed genes in the regeneration of injured spinal cord of neonatal rats

MA Hai-han[1], LIAO Wei-hong[1], WU Ya-min[1], CHU Tong-wei[2] ([1]Department 3, Institute of Surgery, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, 400042, [2]Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, 400037, Third Military Medical University, Chongqing, China)

Abstract: **Objective** To identify the differentially expressed genes of the regenerating motor cortical neurons after hemi-section of the corticospinal tract (CST) of the newborn rats so as to investigate the mechanism in regeneration. **Methods** After hemi-section of the unilateral CST of the newborn rats, fetal spinal cord tissue was transplanted immediately at the local site of the lesion. The differentially expressed genes of bilateral motor cortical neurons of the newborn rats were screened at 3 d after operation using suppression subtractive hybridization method for the construction of differential expression library. The really positive clones were confirmed by blue/white spot test and dot hybridization technique, and their sequences were analyzed. **Results** Compared with the published expressed sequence tags in GenBank, we found that 11 up-regulated genes and 7 down-regulated genes showed distinct homology with 11 and 7 different protein genes, respectively. **Conclusion** There are gene expression changes in the regenerating process of the motor cortical neurons of the newborn rats after fetal spinal cord transplantation. The differential genes may be associated with the regeneration ability of motor cortical neurons.

Key words: fetal spinal cord transplantation; motor cortical neuron; differentially expressed gene; suppression subtractive hybridization

低级脊椎动物(主要是爬虫类和两栖类)肢体损伤后多可再生,高级脊椎动物,尤其是其中枢神经系统,再生能力则大大受限,但研究证实脊椎动物中枢神经系统也具有潜在的再生能力。因此,选择一个合适的脊椎动物再生模型对于再生机制研究非常重要。大量研究事实证明,新生大鼠在脊髓损伤即刻接受胚胎脊髓移植后,可以表现出良好的再生能力。由于皮质脊髓束解剖明确以及其功能可观察,常被用做研究再生和发育的模型。根据皮质脊髓束在延髓交叉及对肢体运动功能单侧支配的特点,我们利用抑制消减杂交技术[1]来检测单侧皮质脊髓束横断以后其同侧运动皮层及对侧运动皮层基因表达的差异性变化,观察表现出再生能力的一侧皮层与其对侧基因表达的差异,分析与再生的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕14 d Wistar大鼠4只,新生1~2 d Wistar大鼠4窝(36只),由第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000173)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000173)
作者简介:马海涵(1972-),女,河南省邓州市人,博士研究生,主要从事中枢神经系统的损伤、再生和修复方面的研究。电话:(023)68757433
收稿日期:2002-10-25;修回日期:2003-01-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 模型制备

1.2.1 胎鼠脊髓组织获取 0.1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射,麻醉成功后孕鼠仰卧位固定于手术台上,消毒、铺巾,沿腹部正中线切开 4~5 cm 切口,钝性分离腹部肌肉,打开腹膜,从大鼠"Y"字型"串珠样"子宫中逐个取出胎鼠,置于预先放有 D-Hank 液的无菌平皿中备用。把放有胎鼠的培养皿置于解剖显微镜下操作,打开背部皮肤,钝性分离背部肌肉,小心除去胸背及腹背部椎板,尽可能多地获取脊髓组织,置于 37 ℃ DMEM 培养基中,剪切成 1 mm×1 mm×1 mm 的颗粒状待用。

1.2.2 新生大鼠脊髓双侧半横切及单侧胚胎脊髓移植术 新生 1~2 d 大鼠 4 ℃低温麻醉后固定于解剖显微镜下操作台上,在 $T_{6\sim8}$ 水平除去椎板,打开脊膜,仔细辨认其后正中沟,用外科显微剪刀在右侧半行脊髓半切。在 $L_{1\sim2}$ 水平除去椎板,打开脊膜,辨认其后正中沟后,用外科显微剪刀在左侧半行脊髓半切。术后即刻用无菌环取供体胚胎脊髓组织填置于 $T_{6\sim8}$ 损伤部位,明胶海绵填塞后,逐层缝合硬脊膜、肌层及皮肤。予大鼠以预防剂量的抗生素,送回交由母鼠喂养,术后 3 d 引颈处死,取其双侧运动区皮层待用。

1.3 实验分组

Tester:左侧大脑皮层组织;Driver:右侧大脑皮层组织。

1.4 实验方法

1.4.1 总 RNA 提取 采用 Boehringer Mannheim 公司 Tripure Isolation Reagent Kit 提取总 RNA。所提 RNA 复溶于无 RNase 的水中,紫外分光光度计(Beckman 640)定量后,用于 cDNA 第一链合成。

1.4.2 cDNA 合成 分别以 Tester 组和 Driver 组 RNA 各 1 μg 为模板,采用 Clontech 公司的 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 及 PCR-Select™cDNA Subtraction Kit 的试剂和酶,合成 cDNA 第一链和第二链。

1.4.3 抑制性消减杂交反应 按 PCR-selecf™ cDNA subtraction kit 说明书进行,PCR 用 Clontech 公司 Advantage cDNA PCR Kit 所配酶和试剂进行。正向 SSH 以损伤对侧运动皮层 cDNA 为 Tester cDNA,损伤侧 cDNA 为 Driver cDNA;逆向 SSH 以损伤侧运动皮层 cDNA 为 Tester cDNA,损伤对侧 cDNA 为 Driver cDNA。PCR-select™ cDNA subtraction kit 试剂盒所配接头和 PCR 引物序列如下:

接头 1:5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTGCCCGTCCA-5′;

接头 2R:5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTCGGCTCCA-5′;

第一轮 PCR

引物:5′-CTAATACGACTCACTATAGGCC-3′

第二轮 PCR

NESTED PCR 引物 1 5′-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3′

NESTED PCR 经物 2R 5′-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′

第二链经纯化、酶切、再纯化后,其产物与 Adaptor1 和 Adaptor2 连接,经检测接头连接效率后进行消减杂交,经两次杂交后检测杂交效果。

1.4.4 PCR 产物克隆和消减杂交 cDNA 文库建立 正向和逆向 SSH 所得 PCR 终产物分别克隆入 pUCm-T 质粒载体,转化入 TOP10F′ *E. coli* 细菌,建立正向和逆向抑制性消减杂交 cDNA 文库。

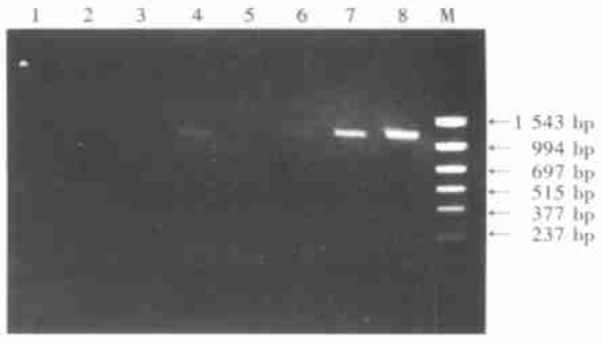
1.4.5 消减杂交 cDNA 文库的筛选 经蓝白斑实验分别挑取正向和逆向消减杂交文库平板上的白色菌斑,用巢式 PCR 反应扩增其中的插入片段。95 ℃ 5 min 变性后,每个插入片段各以 500 ng 点于尼龙膜上(Hybond-N$^+$, Amersham),室温干燥后,80 ℃烤 2 h 固定 DNA。每张尼龙膜各做 2 个拷贝,一个拷贝与 HRP 荧光标记的 Tester 组 cDNA 进行反向 Northern 杂交,另 1 个拷贝与 HRP 荧光标记的 Drivers 组 cDNA 进行反向 Northern 杂交。采用 Pierce 公司的 North2South Direct HRP Labeling and Detection Kit,所有操作按说明书进行,其中 Probe 所用核酸为第二链 cDNA 纯化产物,Marker 为大鼠 G3PDH。

1.4.6 序列测定及同源性分析 证实为真阳性差异表达基因片段的克隆送上海博亚生物工程公司测序。测得的序列输入计算机,通过 Internet 进入 Genbank,对序列进行 BLASTn 比较。

2 结果

2.1 杂交效果验证

按 PCR-select™ cDNA subtraction kit 说明,用 G3PDH 引物通过 PCR 验证 SSH 效果,结果未行 SSH 的第 2 次 PCR 产物于 23 个 CPR 循环时即可观察到明显 PCR 产物条带,而进行了 SSH 的正向和逆向第 2 次 PCR 产物到 33 个 PCR 循环时才可观察到 PCR 产物条带(图 1),表明本实验的消减杂交效果较好。



PCR was performed on subtracted(1—4) or unsubtracted (5—8) secondary PCR product with G3PDH 5′ and 3′ primers; 1, 5: 18 cycles; 2, 6: 23 cycles; 3, 7: 28 cycles; 4, 8: 33 cycles; M: Marker

图 1 PCR-选择性消减后 G3PDH 的丰度衰减

Fig 1 Reduction of G3PDH abundance by PCR-selected subtraction

2.2 基因表达差异片段筛选

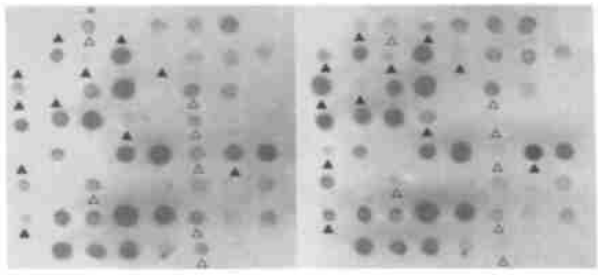
正向和逆向 SSH 反应 PCR 终产物连接 pUC-mT 质粒载体,转化入 TOP 10F′-*E. coli*,转化效率达 1×10^8 cfu/μg DNA。PCR 扩增鉴定,重组率达 80%左右。随机挑选正向和逆向消减杂交重组子各 30 个,插入片段经 PCR 扩增,点于尼龙膜上,经反向 Northern 杂交显示有 11 个 cDNA 克隆与 Tester 组 cDNA 杂交时,信号强,但与 Driver 组 cDNA 杂交时,无信号或信号明显变弱,初步显示这些 cDNA 克隆可能为脊髓受损接受胚胎脊髓移植发

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生再生时上调表达的基因片段。有 7 个 cDNA 克隆与辐照组 cDNA 杂交时, 无信号和信号较弱, 但与对照组 cDNA 杂交时, 信号强, 可能为脊髓受损接受胚胎脊髓移植发生再生时下调表达的基因片段(图 2)。

2.3　序列分析及初步结果

对阳性结果进行序列测定的基础上, 将有效片段输入 Genbank 中, 寻找其同源或相匹配基因, 11 个高表达基因中分别与 11 个不同的蛋白具有不同程度的同源性, 7 个低表达基因中发现分别与 7 个不同的蛋白具有不同程度的同源性, 共 18 个表达变化的基因。我们从正向 SSH 结果中取 4 个结果, 反向 SSH 结果中取 4 个, 结果见表 1。



Left: Forward; Right: Reverse;
▲ Intensive signal; △: Decreased signal

图 2　正向和反向消减杂交结果反向 **Northern blot** 筛选

Fig 2　Results of screening forward and reverse subtraction hybridization

表 **1**　筛选克隆序列分析

Tab 1　Sequence analysis of the screened clones

	Letter	Identity(%)	Expected	Homogenous sequence
1	680	339/344(98)	0.0	*Rattus norvegicus* leukemia-associated cytosolic phosphoprotein (p19) mRNA
2	676	613/640(95)	0.0	*Mus musculus*, similar to dendritic cell protein
3	732	378/380(99)	0.0	*Rattus norvegicus* ATPase synthase subunit 6 mRNA, partial cds cytochrome oxidase subuni III mRNA, completer cds tRNA-Gly gene, complete sequence and NADH dehydrogenase subunit III mRNA, complete cds
4	504	256/282(90)	7e-90	*Homo sapiens* chromosome 5 clone CTC-538E9
−1	687	33/36(91)	0.013	*Homo sapiens* Xp BAC RP11-654E17
−2	655	129/136(94)	6e-51	*Mus musculus* Capn8 gene for stomach specific calpain nCL-2
−3	688	108/109(99)	6e-51	*Mus musculus* serine/threonine protein kinase CISK (Cisk)
−4	656	286/336(85)	4e-67	Mouse DNA sequence from clone RP23-278I21 on chrome 11

3　讨论

在生命发育的不同时期以及不同的生理、病理状态, 组织细胞会有不同的基因表达, 其实, 不同的基因表达形式也反映了机体所处的功能状态。从研究组织细胞的差异表达基因入手, 可以有效的探讨与其生物效应相关的分子机制。

与成年动物相同强度的损伤相比, 未成熟哺乳动物中枢神经系统的损伤常引起更丰富的代偿性轴突生长。随着损伤时动物育龄期的延长, 代偿性增生的数量和生长中的轴突所能到达的超过损伤部位的距离变短。外源性的支持对维持损伤组织的再生能力也有重要作用, 例如外周神经的胶质细胞雪旺细胞移植, 神经营养因子的应用, 胚胎脊髓移植, 神经干细胞移植, 转基因技术的应用等[1,2] 对损伤神经的恢复都有增强作用。其中胚胎脊髓移植的作用较为肯定, 而且技术相对成熟。

本实验利用新生大鼠双侧皮质脊髓束横断后单侧胚胎脊髓移植的损伤模型, 于损伤后即刻进行胚胎 14 d 脊髓局部移植[3]。用抑制性消减杂交的方法建立损伤后 3 d 移植侧及其对侧皮层组织的差异显示性基因文库, 并对文库中的基因片段进行测序及初步分析。

再生现象与伤口愈合及发育时肢体塑形的分子机制有较多相似之处, 一些高度保守的基因在再生中也可能起重要作用。编码 ATP 合酶第 6 亚单位、细胞色素氧化酶第 3 亚单位、甘氨酸 tRNA 及 NADH 脱氢酶第 3 亚单位的全部基因序列, 以及微管蛋白-β 多肽, 在筛选出的差异基因中高水平表达, 提示可能参与了再生与修复的过程, 并在该过程中有活跃作用。受损伤后机体基因表达的这种变化提示这样一种作用模式, 即损伤作为一种强烈的刺激方式激活了特异的通道, 但是当进入了这种通路的开关性枢纽以后, 与生长发育的过程相似, 并由相同的结构蛋白及相关的调节蛋白实现。

常在未成熟脊椎动物细胞中表达的 Metablastin, 即 P19[(白细胞相关的细胞质磷蛋白), leukemia-associated cytosolic phosphoprotein, stathmin, prosolin], P18, Lap18, 或癌蛋白 18, 是高度保守的胞质 149-氨基酸多肽, 编码两个 stathmin 亚型, 是一种神经元内富集的调控发育的磷酸蛋白, 接受细胞外因子及调控细胞周期的丝氨酸磷酸化作用, 可使微管重新分布[4], 从而使受损伤破坏的神经结构得以再生和重建。大鼠皮质损伤 3 d 后双侧皮质差异高表达的基因中, 小鼠丝/苏氨酸

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

激酶(mus musculus serine/threonine protein kinase, CISK)是新发现的蛋白激酶家族的成员,在损伤部位的表达强烈,至少 14 d 内保持非常高的水平,同类实验证明它可能与一系列轴突再生相关[12]。

有些蛋白在机体其他组织已有发现,但是在中枢神经系统被发现尚属首次。例如树状细胞蛋白(dendritic cell protein)DC-HIL,主要在 XS52 树突状细胞系和表皮狼罕氏细胞中高度表达,在其他细胞系中少见,是胞外区域含有肝磷脂结合位点和整合素识别位点的 I 型转膜蛋白。它通过辨认内皮细胞上的乙酰肝素硫酸蛋白多糖,以结合位点依赖的方式诱导内皮细胞的粘附[5]。蛋白 nCL-2 和 nCL-2' 是钙依赖的半胱氨酸蛋白酶超家族中的成员,具有组织特异性[6]。已经在消化系统中证实其存在,部分功能也已经得以阐述,在中枢神经系统出现的确切意义尚待进一步探讨。

例如人 5 号染色体克隆:CTC-538E9,小鼠 11 号染色体克隆:RP23-278I21 等。对于这些基因片段,在进行全长克隆的基础之上,可继续进行相关的结构和功能研究。

参考文献:

[1] 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 U S A, 1996, 93(12): 6025-6030.

[2] Hick J. In search of the lost cord: Solving the mystery of spinal cord regeneration[J]. Spinal Cord, 2003, 41(1): 59-60.

[3] Bernstein-Goral H, Bregman B S. Spinal cord transplants support the regeneration of axotomized neurons after spinal cord lesions at birth: a quantitative double-labeling study[J]. Exp Neurol, 1993, 123(1): 118-132.

[4] Liour S S, Yu R K. Differential effects of three inhibitors of glycosphingolipid biosynthesis on neuronal differentiation of embryonal carcinoma stem cells[J]. Neurochem Res, 2002, 27(11): 1507-1512.

[5] Shikano S, Bonkobara M, Zukas P K, *et al*. Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 8125-8134.

[6] Hata S, Nishi K, Kawamoto T, *et al*. Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution[J]. J Mol Evol, 2001, 53(3): 191-203.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)01-0028-01

蓝色橡皮-大疱性痣综合征 1 例

Blue rubber bleb nevus syndrome: a case report

杨 超,宫立众,夏顺中,张红宾,李 倩 (第三军医大学西南医院血液科,重庆 400038)

患者,男,17 岁,因头昏、乏力、面色苍白 10 余年入院。患者于 1993 年无明显诱因出现头昏、乏力、活动后气急、食欲减退,同时发现面色苍白。有多次柏油样大便史。在当地医院检查示贫血(具体不详),予以中药治疗,病情无明显好转。1997 年到外院就诊,骨髓象示:缺铁性贫血。予以输血和药物治疗,病情好转后出院。回家后服中药治疗,贫血症状进一步加重。父母非近亲结婚,足月顺产。查体:发育欠佳,重度贫血貌,面色蜡黄。右侧锁骨上可见淡蓝色、4 cm× 5 cm 包块,质软、压迫后缩小并颜色变浅;全身皮肤散在可见 0.5 cm× 0.5 cm 至 1.5 cm× 1.5 cm 的结节,高出皮肤、乳头状、紫蓝色、质软、压之可褪色、轻压痛、表面呈细颗粒状。左脚腹侧可见多个黄豆大小、蓝紫色、不高出皮肤、质硬(角化)、压后褪色的皮肤改变。血象:Hb 33.2 g/L, MCV 60.5 fl, MCHC 239 g/L, MCH 14.5 pg, WBC 2.38 $\times 10^9$/L, PLT 138$\times 10^9$/L。连续 3 d 大便常规正常,隐血试验(-),虫卵(-);尿常规(-);骨髓象:增生活跃,红系占 0.43,其中中晚幼红细胞胞浆量少,染色偏蓝;成熟红细胞体积偏小,中心苍白区扩大,铁染色:内铁 0,外铁(-)。胃镜示:食道、胃窦部散在数个直径约 0.5~0.6 cm 粘膜隆起,表面紫色血管纹理,未见活动出血。皮肤血管瘤活检:皮肤血管扩张,炎细胞浸润。左侧锁骨上包块彩超:考虑血管瘤。诊断:蓝色橡皮-大疱性痣综合征(blue rubber bleb nevus syndrome, BRBNS)。予以铁剂肌肉注射,2 周后 Hb 升至 70.2 g/L 出院。出院后继续肌肉注射铁剂,嘱进食软食。

讨论

根据患者有贫血症状,血象和骨髓象支持小细胞低色素性贫血,皮肤和纤维胃镜的多发性血管瘤、组织病理学和彩超支持为血管瘤,诊断 BRBNS 成立。

BRBNS 由 Bean 于 1958 年提出,故又称 Bean 综合征。主要

(下转 35 页)

作者简介:杨 超(1971-),男,四川省蓬溪县人,主治医师,主要从事白血病方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)65387300
通信作者:宫立众,E-mail:gonglizhong@hotmail.com

收稿日期:2003-09-04;修回日期:2003-12-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net