DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.033
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

文章编号:1000-5404(2002)06-0705-04

论著

小鼠轻型肠型放射病肠上皮细胞差异表达基因的筛选研究

胡川闽[1],粟永萍[1],程天民[1],王军平[1],刘贤华[1],王晓东[2],冉新泽[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,[2]附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 筛选经辐射诱导后小鼠肠上皮细胞的差异或特异表达基因。方法 通过基因库检索和计算机分析,设计出较通用的5′端武断引物在基因库中其呈现几率要高出数倍到数十倍的4条5′端高同源mRNA差示引物,应用DDRT-PCR,测序凝胶电泳,放射自显影,分子杂交等方法,分析并筛选小鼠受12Gy γ射线全身照射后3 h(R1组)和96 h(R2组)肠上皮细胞差异或特异表达基因。结果 5′端高同源性引物mRNA差异结果显示,与正常比较,小鼠全身12Gy照射后不同时相的肠上皮细胞基因表达存在差异,从近8 000条PCR扩增产物中,比较筛选出12个差异表达基因片段。RNA-blot杂交对11个辐射损伤情况下差异表达基因片段进行了鉴定。R1S1和R1S2差异基因片段在辐射损伤后3 h的肠上皮细胞中呈特异性表达;R2S2和R2S5基因片段在辐射损伤后96 h的肠上皮细胞中呈特异性表达;R2S1、R2S6和R2S8基因片段是假阳性差异表达基因片段;而R2S1、R2S4及R2S8用RNA-blot法检测不到表达。序列分析结果显示R1S1和R2S2在基因库中未见高同源的基因序列,与R1S1同源性最高(60.00%)的是一个源于大鼠输卵管特异性糖蛋白基因,R2S5与一种小鼠肌细胞钙离子信号传导分子有67.21%的同源性;R2S2高度同源于鼠源性肿瘤诱导蛋白p32(91.52%);R1S2在基因库中未检测到同源基因。结论 证实高同源引物具有良好的代表性和呈现几率,并筛选和鉴定出与辐射诱导的肠上皮损伤和修复相关的一组差异或特异表达基因。

关键词:辐射损伤;基因克隆;差异显示;同源性
中图法分类号:R322.45;R394-33;R818.74 文献标识码:A

Screening for differentially expressed genes of intestinal epithelial cells derived from mice with mild intestinal type of radiation sickness with high homological primer DDRT-PCR

HU Chuan-min, SU Yong-ping, CHENG Tian-min, WANG Jun-ping, LIU Xian-hua, WANG Xiao-dong, RAN Xin-ze (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injuries, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To screen the differentially expressed intestinal epithelial cells (IECs) derived from mice with mild intestinal type of radiation sickness by high homological primer DDRT-PCR. **Methods** A set of 4 highly homologenic 5′ primer was designed through computer analysis and Genbank searching, and used to replace the 20 5′ arbitrary primers in the mRNA differential display. The higher display rate of mRNA was available after the modified DDRT-PCR had been taken in comparison with the routine 5′ arbitrary primer's display. By means of the modified DDRT-PCR and comparison with normal control, 12 differentially expressed genes of IECs derived from mouse mild intestinal type of radiation sickness were isolated from 10 000 DDRT-PCR products displaying on the sequencing gels. Eleven differentially expressed genes were identified with RNA-blotting hybridization. **Results** The results showed that R1S1 and R1S2 were highly specifically expressed at the IEC's early damage phase (3 h) after 12 Gy γ-ray radiation, and that R2S2 and R2S5 were specifically expressed in the IEC's regeneration phase (96 h) after 12 Gy γ-ray radiation. R2S1, R2S6 and R2S8 were false differentially expressed genes because the expressions of R2S1, R2S4 and R2S8 were measured with RNA-blotting hybridization. The highest score homological gene of R1S1 in the GenBank was a specific mouse oviduct glycoprotein. There was no homological gene to R1S2 in the GenBnak. R1S5 was 67.21% homological to a murine calcium signal molecule and R2S5 was highly homological (91.52%) to a tumor induced protein gene (p32). p32 which was high homological to R2S2 was a member of the tumor induced protein BRCA gene family. BRCA 2, one member of the BRCA gene family had also been found in our cDNA microarray experiment, was specifically expressed in the IECs of the regeneration phase after radiation injury. **Conclusion** The function of R2S2 and R2S5 may be associated with the repair of intestinal epithelium. BRCA gene family maybe plays a very important role in the IECs damage induced by radiation. R2S2 may be a new member of BRCA gene family.

Key words: radiation injury; gene clone; DDRT-PCR; homology

肠上皮细胞是辐射损伤的主要靶细胞之一,有关辐射诱导的肠上皮损伤的病理变化等研究已有不少报道[1~4],但其分子水平的发生机制尚未阐明。本研究应用新近进展的高同源引物mRNA差异显示技术,通过比较正常小鼠和轻型肠型放射病小鼠损伤早期与肠上皮再生期肠上皮细胞的基因表达变化,克隆和鉴定轻型肠型放射病诱导的肠上皮损伤和再生的差异表达基因,为进一步研究辐射诱导的肠上皮损伤与修复的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770237)及国家教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目
作者简介:胡川闽(1963-),男,四川省合江县人,博士,副研究员,主要从事放射病理学与分子生物学方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-09-28;修回日期:2002-01-12

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

分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

mRNA 提取 kit、cDNA 反转录 kit、T7 DNA Sequencing、质粒载体 pGEM-3zf(+)，购自 Promega 公司，^{32}P-dATP 购自北京亚辉公司，Taq DNA 聚合酶购自 Sangong 公司。大肠杆菌 DH5α，supE44，lacU169，lacZM15，hsdR17，recA1，endA1，gyrA96，thi-1，relA1，本室留种。

1.2 引物序列与合成

1.2.1 差示引物 ① 3′端锚定引物 P1-P4，按文献[5]设计。② 5′端高同源引物 P5：5′-AGCCACCATG-3′（320）A+C 序列、P6：5′-GGAGGAGAAG-3′（454）G+A 序列、P7：5′-GCATGGTGGC-3′（383）G+T 序列、P8：5′-CTTCTATCCG-3′（247）C+T 序列，均由中科院微生物所贝克曼实验室合成。③5′端武断对照引物 Pc：5′-CAGTGTGTGA-3′，按文献[5]设计。

1.2.2 测序引物 ①T7 启动子 5′-ATTATGCTGAGTGA-TATCCCGCT-3′；② SP6 启动子 5′-ATTTAGGTGACAC-TATAGAATAC-3′，由中科院上海细胞所合成。

1.3 动物分组及致伤

健康雄性 BALB/c 和昆明种小鼠 400 只，体重 20～25 g，由本校实验动物中心提供。实验设正常组（N 组）60 只和照射后 3 h 组（R1 组）60 只、96 h 组（R2 组）280 只（因多数动物死亡）。照射组小鼠采用 ^{60}Co-γ 射线 12 Gy 全身照射，照射距离 1.0 m，照射剂量率为 136 cGy·min^{-1}。

1.4 肠上皮细胞总 RNA 及 mRNA 的纯化

各组每批次活杀 5 只小鼠，开腹取出全小肠，按文献[6,7]方法作肠上皮细胞分离和总 RNA 提取；mRNA 纯化按 kit 操作说明。

1.5 差示 PCR 及差异条带的分离、纯化

差示 PCR 按文献[8,9]方法。差示 PCR 产物经测序胶电泳后，揭胶，压片，曝光，读 X 光片，比较样本之间放射性条带的差异，将与 X 光片上差异条带相对应的胶切下，放入 1.5 ml EP 管内。参考 Liang 等[5,10]的方法，对分离后的差异条带进行纯化和再扩增。

1.6 差异片段的克隆

再次 PCR 产物经 Klenow 酶补平后连接于经 *Sma* I 酶切过的 pGEM-3zf(+)质粒中，常规方法进行 DH5α 感受态制备及转化反应，重组子的筛选和鉴定参照文献[11]进行。

1.7 斑点杂交验证差异片段的特异性

按地高辛探针标记 kit 操作说明，对差异片段进行探针标记，然后按常规方法进行 RNA-blot。

1.8 双脱氧终止法测定 DNA 序列

测序反应按 Sequence kit 说明书操作。

2 结果

2.1 差示 PCR

通过变换引物组合差异展示了正常小鼠及 12 Gy 照射后 3 和 96 h 的小肠上皮细胞 mRNA，发现两种细胞的电泳谱带并不完全一致，共出现 14 条差异条带，其中 1 条为正常对照细胞所特有，命名为 CS1；3 条为放射损伤 3 h（R1 组）细胞所特有，命名为 R1S1-R1S3，见图 1；8 条为放射损伤 96 h（R2 组）细胞所特有，命名为 R2S1-R2S8，见图 2。

2.2 差异条带的回收及再扩增

差异条带切下后，通过再次 PCR 可以使差异片段得到扩增，除不加同位素外，第二次 PCR 条件与第一次基本相同。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见清晰、特异的目的条带，见图 3。

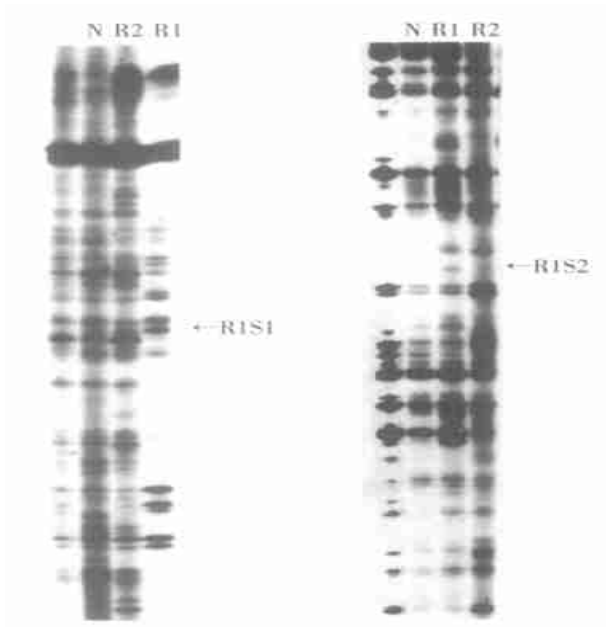


图 1 照射 3 h 肠上皮细胞特异性条带 R1S1，R1S2（DDRT-PCR）

Fig 1 R1S1，R1S2 fragments displayed in IECs 3 h post-irradiation（DDRT-PCR）

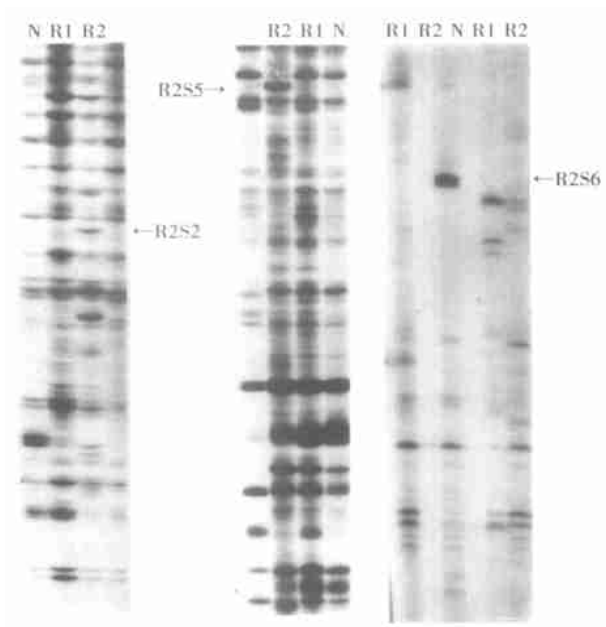
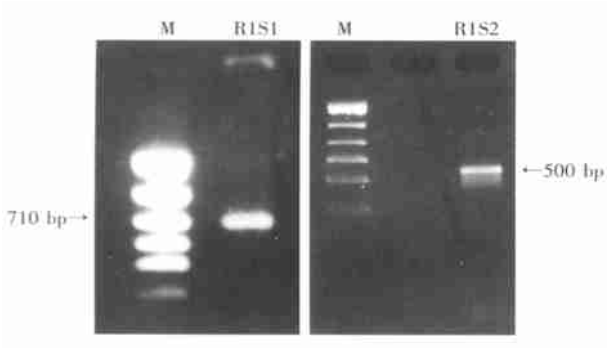


图 2 照射 96 h 肠上皮细胞特异性条带 R2S2，R2S5，R2S6（DDRT-PCR）

Fig 2 R2S2，R2S5，R2S6 fragments displayed in IECs 96 h post-irradiation（DDRT-PCR）

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



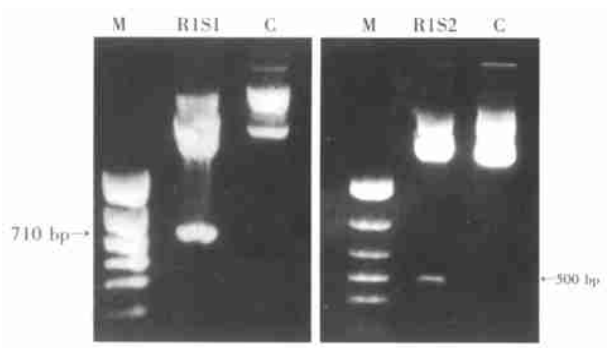
M: PCR marker; R1: 3 h radiation

图 3　扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳示 R1S1 和 R1S2 阳性

Fig 3　Reamplified R1S1 and R1S2 fragments on 1.5% agarose gel

2.3　PCR 产物的克隆及阳性重组的筛选与鉴定

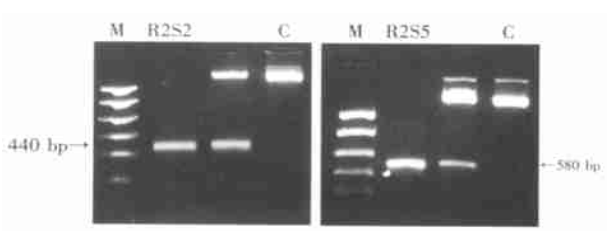
质粒经 *EcoR* Ⅰ / *Sal* Ⅰ 双酶切后电泳观察, 用插入片段对应引物对阳性重组子进行 PCR 扩增, 产物片段大小与插入片段基本相同, 见图 4, 5。



M: PCR marker; C: plasmid control; R2: 3 h radiation, R1S1 (710 bp), R1S2 (500 bp)

图 4　*EcoR* Ⅰ / *Sal* Ⅰ 限制性内切酶酶切鉴定 R1S1 和 R1S2 重组质粒

Fig 4　Identification of R1S1 and R1S2 recombinant plasmids with *EcoR*Ⅰ / *Sal*Ⅰ restriction endonuclease digestion



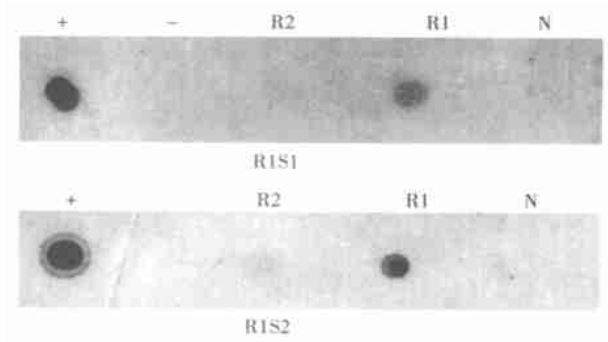
M: PCR marker; C: plasmid control; R2: 96 h radiation, R2S2 (440 bp), R2S5 (580 bp)

图 5　R2S2 和 R2S5 扩增、克隆入 pGEM-3zf(+) 质粒

Fig 5　Insertion of amplified R2S2 and R2S5 into the plasmid pGEM-3zf(+)

2.4　辐射 3 h 组 DDRT-PCR 差异片段杂交结果

R1S1 和 R1S2 探针在 12 Gy 照射 3 h 后的肠上皮细胞总 RNA 点样处呈明确的特异性阳性反应, 见图 6; R1S3 探针杂交时, 仅阳性对照显色; 正常组及照射组肠上皮细胞点样处均为阴性, 表明在正常及放射损伤肠上皮细胞中斑点杂交手段检测不到 R1S3 的表达。



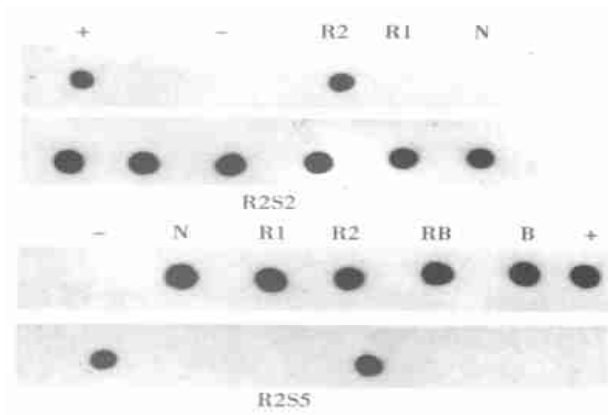
+: Positive control; −: Negative control; N: Total RNA of IECs from normal mice; R1: 3 h radiation; R2: 96 h radiation

图 6　R1S1 和 R1S2 杂交结果(RNA-blot)

Fig 6 Hybridization of R1S1 and R1S2 with RNA-blotting

2.5　辐射 96 h 组 DDRT-PCR 差异片段杂交结果

R2S2 和 R2S5 探针在 12 Gy 照射 96 h 后的肠上皮细胞总 RNA 点样处呈明确的特异性阳性反应, 见图 7。R2S1、R2S4 及 R2S8 探针杂交时, 仅阳性对照显色; 正常组及照射组肠上皮细胞点样处均为阴性, 表明正常及放射损伤肠上皮细胞中以斑点杂交手段均检测不到 R2S1、R2S4 及 R2S8 的表达。



+: Positive control; −: Negative control; N: Total RNA of IECs from normal mice; R1: 3 h radiation; R2: 96 h radiation; RB: Radiation and burn; B: Burn

图 7　R2S2 和 R2S5 杂交结果(RNA-blot)

Fig 7　Hybridization of R2S2 and R2S5 with RNA-blotting

2.6　测序结果及序列分析

对 RNA-blot 杂交有明确特异性的 4 个差异基因片段 R1S1、R1S2、R2S2 及 R2S5 进行序列分析, 除手工测序的 R1S2 片段未读到 5′端引物外, 均在序列中查到所设计的高同源 5′端引物。将已测得的 R1S1、R1S2、R2S2 及 R2S5 基因片段序列, 按文本文件格式输入计算机, 在 Internet 网上通过电子邮件(E-mail)和进入基因库主页(Home page)两种方式进行同源性检索, 结果两种数据库检索结果完全一致。R1S1 和 R2S2 在基因库中未见高同源的基因序列, 与 R1S1 同源性最高(60.00%)的是一个源于大鼠输卵管特异性糖蛋白基因, R2S5 与一种小鼠肌细胞钙离子信

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

号传导分子有 67.21% 的同源性; R2S2 高度同源于鼠源性肿瘤诱导蛋白 P32(91.52%); R1S2 在基因库中未检测到同源基因(序列表略)。

3 讨论

以往研究表明[1~3],小鼠 12Gy γ 射线一次性全身照射后可发生轻型肠型放射病,此时肠上皮严重破坏,但仍具再生潜力;伤后 1 h,小肠隐窝核分裂象开始消失,大量细胞变性坏死,12 h 时部分隐窝细胞核开始增大,48 h 时在残存隐窝和绒毛底部出现畸形细胞,60 h 时出现再生隐窝。因受条件制约,有关辐射损伤机制的认识长期停留在电离辐射引起的 DNA 分子损伤上,对辐射诱导的基因表达变化研究不多。近年来随着分子生物学技术的发展,我们应用 cDNA 微阵列技术,与正常动物对照,观察了包括癌/抑癌基因、细胞周期调节、细胞凋亡、DNA 损伤和修复、转录因子、DNA 结合蛋白、细胞粘附、受体、信号传导等 14 大类共 588 种功能基因在小鼠轻型肠型放射病肠上皮细胞中的表达情况,绘制了小鼠正常及轻型肠型放射病早期与肠上皮再生期的表达基因和差异表达基因图谱,提示轻型肠型放射病时基因表达出现明显的差异,并发现不同时相的高表达和特异性表达基因,为阐明轻型肠型放射病发生的分子机制提供了有益的线索。然而,真核生物一般有 10 万个基因,虽然对于每一种特定细胞仅表达其中的 15%,估计肠上皮细胞中至少应有上万种表达基因存在。因此,从更大的范围内寻找和克隆可能存在的辐射诱导的肠上皮细胞差异或特异表达基因,阐明辐射诱导的肠上皮损伤与修复的分子机制,具有重要意义。

本研究创新性地将 5′端高同源性引物引入 mRNA 差异显示技术中,与正常动物比较,小鼠 12Gy 照射后不同时相的肠上皮细胞基因表达存在差异,从近 8 000 条 PCR 扩增产物中,筛选出 12 个差异表达基因片段。RNA-blot 杂交对 11 个辐射情况下差异表达基因进行鉴定的结果显示,R1S1 和 R2S5 基因片段在辐射 3 h 的肠上皮细胞中呈特异性表达,R2S2 和 R2S5 基因片段在辐射 96 h 的肠上皮细胞中呈特异性表达,R2S3、R2S6 和 R2S7 基因片段是假阳性差异显示片段,而 R2S1、R2S4 及 R2S8 用 RNA-blot 检测不到表达。序列分析显示 R1S1 和 R2S2 在基因库中未见高同源的基因序列,与 R1S1 同源性最高(60.00%)的是一个源于大鼠输卵管特异性糖蛋白基因,R2S5 与一种小鼠肌细胞钙离子信号传导分子有 67.21% 的同源性;R2S2 高度同源于鼠源性肿瘤诱导蛋白 P32(91.52%);R1S2 在基因库中未检测到同源基因。

辐射损伤 3 h 的特异表达基因 R1S1 和 R1S2,因在现有基因库中未检索到高同源基因序列,它们的功能待其全长基因克隆和功能研究鉴定后才能确定。辐射损伤 96 h 的特异表达基因 R2S2 和 R2R5,因分别与鼠源性肿瘤诱导蛋白 P32 和一种钙离子信号传导分子有 91.52%和 67.21%的同源性,其功能可能与肠上皮修复有关。特别是与鼠源性肿瘤诱导蛋白 P32 有 91.52%同源性的 R2S2 的基因片段,在我们 cDNA 微阵列研究中,也发现辐射 96 h 肠上皮细胞内乳腺癌相关基因 BRCA 2 基因特异性开放,经互联网检索获悉鼠源性肿瘤诱导蛋白 P32 是 BRCA 基因家族的一个成员,用不同的基因分析方法均发现辐射损伤肿瘤诱导蛋白的特异表达,提示肿瘤诱导蛋白在辐射诱导的肠上皮损伤中可能具有特殊作用[12, 13]。由于 R2S2 基因片段与 P32 蛋白不完全同源,而 cDNA 微阵列杂交时只要有较高的同源性,即可杂交出阳性信号,故 R2S2 所代表的基因是否为 BRCA 基因家族中的一个新成员以及它在辐射损伤中的确切功能,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 粟永萍,程天民. 小鼠放射损伤和放伤复合伤的肠上皮畸形细胞[J]. 第三军医大学学报,1987,9(4):393-395.

[2] 粟永萍,程天民,刘贤华. 放射损伤及放烧复合伤对小肠皮损害的量效研究[J]. 第三军医大学学报,1994,16(5):313-315.

[3] 艾国平,粟永萍,刘晓宏,等. 放射损伤合并烧伤肠源性感染发生特点的实验研究[J]. 第三军医大学学报,1997,19(5):405-407.

[4] 徐 辉,程天民,粟永萍,等. 小鼠全身辐射后对小肠上皮内淋巴细胞形态及功能的影响[J]. 第三军医大学学报,1998,20(4):281-284.

[5] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5 072): 967-971.

[6] Evans E M, Wrigglesworth J M, Burdett K, *et al*. Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine [J]. J Cell Biol, 1997, 51(21): 452-464.

[7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159.

[8] Lohmann J, Schickle H, Bosch T C. REN dosplay a repid and efficient method for noradioactive differential display and mRNA isolation[J]. Biotechniques, 1995, 18(2): 200-202.

[9] Mou L, Miller H, Li J, *et al*. Improvements to the differential display method for gene analysis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(2), 564-569.

[10] Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(14): 3 269-3 275.

[11] 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993. 292-302.

[12] Kageyama H, Hiwasa T, Tokunaga K, *et al*. Isolation and characterization of a complementary DNA clone for a Mr 32, 000 protein which is induced with tumor promoters in BALB/c 3T3 cells [J]. Cancer Res, 1988, 48(17): 4 795-4 798.

[13] Hiwasa T, Sakiyama S. Increase in the synthesis of a Mr 32, 000 protein in BALB/c 3T3 cells after treatment with tumor promoters, chemical carcinogens, metal salts, and heat shock [J]. Cancer Res, 1986, 46(5): 2 474-2 481.

(编辑 王 红)

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