DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.001
第21卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 21, No. 6
1999年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 1999

辐射小鼠肠上皮细胞损伤相关基因的初步鉴定*

论著

王军平** 胡川闽 粟永萍 程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所) 重庆,400038

提 要 目的:寻找肠上皮细胞辐射损伤相关基因,探讨辐射致肠上皮损伤的分子发生机制。方法:用mRNA差异显示技术比较研究12 Gy γ射线辐射损伤前后小鼠小肠上皮细胞间基因表达的异同,分离并克隆差异表达基因片段,斑点杂交验证其表达特异性。结果:寻找并成功地克隆到一条辐射损伤特异表达基因片段RS_2。结论:RS_2所代表的基因有可能为新发现的肠上皮辐射损伤相关基因。

关键词 肠上皮细胞;辐射损伤;mRNA差异显示;克隆
中图法分类号 R394.3;R818-332

肠上皮细胞是构筑肠道屏障的主要组成部分,在维持机体生命活动中居重要地位,因对辐射敏感,肠上皮细胞是辐射损伤的主要靶细胞之一。在核爆炸、核事故和腹部放疗等情况下,肠上皮会经历一系列病理变化,但其分子层次的发生机制尚未阐明[1]。为此,我们运用新近发展起来的mRNA差异显示(Differential display,DD)技术[2,3],比较研究了12 Gy γ射线照射前后小鼠小肠上皮细胞间基因表达的差异情况,并对差异表达基因片段进行克隆与初步鉴定,以期获得辐射损伤相关基因,进而为揭示电离辐射诱导肠上皮细胞损伤的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物致伤及分组

健康雄性昆明种小鼠,体重20~25 g。分正常和放射损伤组,放射损伤组予以^{60}Co γ射线12 Gy全身一次性照射。照射距离1.5 m,照射剂量率为0.125 Gy/min。

1.2 肠上皮细胞的分离

正常及照后3 h小鼠脱颈致死,采用Evans等[4]的方法分离小肠上皮细胞,显微镜下观察细胞形态并计数。

1.3 总RNA的提取

采用异硫氰酸胍一步法分别提取两种细胞总RNA,紫外分光检测提取结果,以OD_{260}/OD_{280}值接近2.0为纯度满意,同时进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

1.4 DDRT-PCR

1.4.1 引物 3′端锚定引物共4条:T11(AGC)N,其中N分别为4种碱基中的一种;5′端任意引物共4条,分别为:5′-AGCCACCATG-3′、5′-GGAGGAGAAG-3′、5′-GCATGGTG-GC-3′、5′-CTTCTCCTCC-3′(北京中科院微生物研究所贝克曼实验室合成)。

1.4.2 单链cDNA的合成 分别以4条3′端锚定引物对正常及照后3 h肠上皮细胞总RNA进行逆转录反应,反应体积为20 μl,每管含2 μg RNA,1 μmol/L 3′端锚定引物T11(AGC)N,50 U的AMV逆转录酶(Promega公司产品),42℃水浴1 h,反应产物稀释5倍后进入下一步反应。

1.4.3 差异显示PCR 反应体积为25 μl,含1 μl稀释后逆转录产物;1 μmol/L对应的3′端锚定引物;1 μmol/L任一种5′端任意引物;1.5 μmol/L $MgCl_2$;2.5 μmol/L dNTP混合物;5 μCi[^{32}P]-dATP(北京亚辉公司产品);3 U的Taq酶(华美生物工程公司产品)。在Amplitron Ⅱ型PCR扩增仪上按以下条件进行PCR扩增:94℃ 90 s,42℃ 90 s,72℃ 60 s,反应40个循环,再72℃延伸10 min。同时设一对照管,除模板为未经逆转录的总RNA外,其它条件同上。

1.5 差示PCR产物的电泳及放射自显影

PCR产物5 μl加1 μl载样缓冲液(Promega公司产品)混合,在6%变性测序胶上,50 W恒功率电泳6 h,然后进行放射自显影24~48 h。

1.6 差异条带的回收

根据放射自显影结果,从胶上割下辐射损伤后的肠上皮细胞与正常肠上皮细胞间差异显示的区带,加100 μl双蒸水,室温放置10 min,沸水煮15 min,按方法1.4.3再次进行PCR(此次不加同位素),以扩增得到的cDNA片段。

1.7 差异表达基因片段的克隆

用Klenow酶(华美生物工程公司产品)将再次PCR产物补平,纯化后连接于预先经*Sma* Ⅰ酶(宝灵曼公司产品)切过的pGEM-3zf(+)测序质粒载体中,转化大肠杆菌DH5α,经蓝-白筛选鉴定重组子。

1.8 探针标记及斑点杂交

以*EcoR* Ⅰ、*Sal* Ⅰ(宝灵曼公司产品)双酶切含有差异表达基因片段的阳性重组质粒,回收、纯化差异表达基因片段,对其进行地高辛标记(地高辛标记kit购自德国宝灵曼公司),然后用其对正常及照射损伤肠上皮细胞总RNA进行斑点杂交。

2 结果

2.1 小肠上皮细胞总RNA的提取

提取分离后的小肠上皮细胞总RNA,经甲醛变性凝胶电泳显示可见28 S、18 S、5 S rRNA 3条带和介于它们之间呈云雾状的mRNA,表明RNA分子完整,没有发生降解。同时用总RNA为模板进行PCR扩增,测序胶电泳未见条带出现,说明RNA中没有DNA的污染。

2.2 DDRT-PCR

PCR产物经测序胶电泳展示可见每个样品约有数十至上

* 国家自然科学基金资助项目,No.39770237,解放军总后勤部杰出人才基金、重庆市中青年科研基金资助
** 王军平,男,26岁,助教,博士研究生

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

百条带谱，正常与γ射线 12 Gy 照射后 3 h 的小鼠肠上皮细胞的电泳带谱基本相同。初步观察发现一条差异表达带，仅于放射损伤肠上皮细胞中可见，而正常肠上皮细胞中不存在，长约 470 bp，我们将其命名为 RS_2，见图 1。

2.3 RS_2 的克隆

RS_2 经煮沸法回收后，通过再次 PCR 可以使其得到扩增，扩增产物与载体 pGEM-3zf(+)连接并转化大肠杆菌 DH5α 后，阳性重组质粒经 *EcoR* Ⅰ、*Sal* Ⅰ 双酶切，可切下与插入片段大小基本相同的 cDNA 片段，见图 2。

2.4 斑点杂交

结果显示 RS_2 仅于放射损伤肠上皮细胞中有一定水平的表达，在正常肠上皮细胞中未见表达，见图 3。

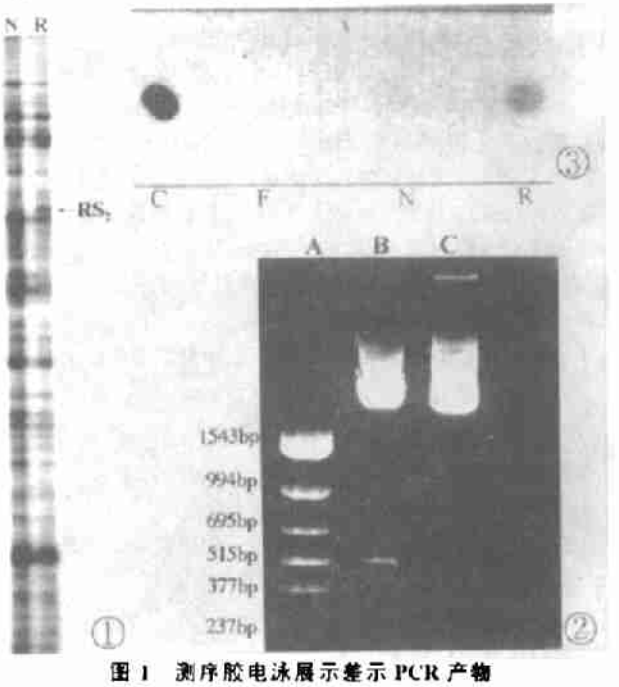


图 1 测序胶电泳展示差示 PCR 产物

N：正常小鼠小肠上皮细胞；R：12 Gy γ射线照射后 3 h 小鼠小肠上皮细胞

Fig 1 Electrophoresis of DDRT-PCR products on sequencing gel

N: Normal intestinal epithelial cells; R: 12 Gy γ-ray irradiated intestinal epithelial cells

图 2 RS_2 阳性重组质粒双酶切电泳图谱，可见重组质粒经 *EcoR* Ⅰ、*Sal* Ⅰ 切下 500±bp 片段(含部分载体序列)

A：PCR Markers；B：RS_2 阳性重组子 *EcoR* Ⅰ/*Sal* Ⅰ 双酶切产物；C：pGEM-3zf(+)质粒对照

Fig 2 Identification of recombinant plasmid containing of RS_2 by *EcoR* Ⅰ and *Sal* Ⅰ digestion

A: PCR markers; B: Positive recombinant plasmid digested by *EcoR* Ⅰ and *Sal* Ⅰ; C: pGEM-3zf(+) plasmid

图 3 RS_2 斑点杂交结果

C：阳性对照；F：阴性对照；N：正常小鼠小肠上皮细胞总 RNA；R：12 Gy γ射线照射后 3 h 小鼠小肠上皮细胞总 RNA

Fig 3 RNA-blot hybridization of RS_2

C: Positive control; F: Negative control; N: Normal intestinal epithelial cells; R: 12 Gy γ-ray irradiated intestinal epithelial cells

3 讨论

小肠是辐射敏感器官，在放射损伤后发生明显的病理变化及特殊的损伤修复过程。我室以往的研究表明：小鼠受 12 Gy γ射线一次性全身照射后，1 h 时小肠隐窝核分裂相消失，大量细胞开始变性坏死；12 h 至 24 h 时余留的隐窝细胞核增大；48 h 时残存隐窝和绒毛底部出现畸形细胞[1]。以往对这些变化机理的认识大多归之于电离辐射引起的 DNA 碱基置换、碱基突变、链断裂、链交联以及染色体畸变等[5]，至于基因表达变化的研究则较少。虽然近年有人发现辐射可以诱导某些"即早表达基因"表达[6]，但就其研究途径和方法来讲，大都是先经人们推测，然后选出一些候选基因(多为原癌基因或细胞因子)，再通过 Northern 杂交检测它们在辐射后的表达变化，从而找出所谓"即早表达基因"。因而这种方法具有一定的局限性，难以用来寻找新的辐射损伤与修复相关基因。

mRNA 差异显示是近年来发展起来的一种研究差异表达基因的新方法。该方法是从mRNA或总 RNA 入手，利用 PCR 扩增和测序凝胶电泳技术快速、高效地分析两个乃至众多组织或细胞中所有的 mRNA，从中找出差异表达的基因片段，然后再进行克隆和杂交鉴定。与传统消减杂交相比，mRNA 差异显示具有简单、快速、灵敏、高效等优点，目前已被广泛地应用于生物医学领域[7,8]。本实验运用该技术，通过比较放射损伤小鼠小肠上皮细胞与正常小鼠小肠上皮细胞 mRNA 指纹来反映基因表达的变化，并克隆差异表达基因片段。初步研究发现一条辐射损伤肠上皮细胞特异表达基因片段－RS_2，此结果表明小鼠辐射损伤后小肠上皮细胞的基因表达的确发生异常。至于 RS_2 所代表的全长基因及其生物学特性等正拟进一步研究。

本实验结果说明：mRNA 差异显示技术能够寻找到小肠上皮细胞辐射损伤相关基因，通过反复的筛选和功能鉴定，有可能揭示辐射引起肠上皮细胞损伤的分子机制，进而为放射损伤的防治提供新的理论依据和技术途径。

参考文献

1 程天民. 创伤战伤病理学. 北京：解放军出版社，1992. 358～366

2 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257(5072): 967

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

3 Reuber T L, Ausubel F M. Differential mRNA display. Methods Cell Biol, 1995, 49: 431
4 Evans E M, Wrigglesworth J M, Burdett K, *et al*. Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine. J Cell Biol, 1971, 51(2): 452
5 罗成基，欧阳子倩. 核、化学武器损伤防治学. 北京：人民军医出版社，1994. 26～37
6 Brach M A, Hass R, Sherman M L, *et al*. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor. J Clin Invest, 1991, 88(2): 691
7 Groningen J J N V, Bloemers H P J. Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. Cancer Res, 1995, 55(24): 6237
8 Zhang J, Zhang L. Rapid identification of differentially expressed RNA transcripts in apoptotic T lymphocytes. J Immunol Methods, 1996, 195(1～2): 113

（收稿：1998-10-23；修回：1999-03-31）
（编辑　陈聪连）

Preliminary identification of the genes expressed in intestinal epithelial cells after radiation injury in mice*

Wang Junping, Hu Chuanmin, Su Yongping, Chen Tianmin (Institute of Combined Injury of PLA, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To identify the genes specially expressed in the intestinal epithelial cells (IECs) after radiation injury in order to elucidate the molecular mechanism of ionizing radiation-induced damages of IECs. Methods: mRNA differential display was employed to observe the difference of the genes expressed in normal IECs and in those 3 h after 12 Gy gamma ray irradiation. Then the differentially expressed gene was cloned and identified with dot hybridization. Results: A differentially expressed gene (RS_2) induced by gamma ray radiation was successfully cloned. Conclusion: RS_2 might be one of the genes related to the IEC damages induced by ionizing radiation.

Key words intestinal epithelial cell; ionizing radiation; mRNA; differential display; clone; mouse

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39770237

2 例临床同种异体原位肝移植成功

消息

Two cases of successful orthotopic liver transplantation

最近，我院肝胆外科中心成功地完成了 2 例临床同种异体原位肝移植。

例 1，男性，36 岁。诊断：①肝细胞癌，右肝前叶、左肝内叶，巨块型，伴门静脉左、右支癌栓；②肝炎后肝硬变。经肝动脉化疗后 10 天，于 5 月 7 日在全麻下行原位肝移植术。手术历时 12 小时 40 分，经过顺利。术后无外科并发症发生。术后联合应用环孢霉素 A、霉酚酸酯（骁悉）、甲基强的松龙三联抗排异反应，术后 2 周时出现急性排斥反应，经大剂量甲基强的松龙冲击治疗后控制。术后 40 天出院时，肝酶谱及胆红素水平降至正常，血清白蛋白及凝血酶原水平正常，已恢复正常生活。

例 2，男性，34 岁。诊断：①肝细胞癌，左、右肝，弥漫型，伴门静脉左、右支癌栓；②肝炎后肝硬变。于 6 月 22 日在全麻下行原位肝移植术。手术历时 11 小时，经过顺利。术后病情平稳。

在短时期内，完全依靠自己的力量，连续 2 例临床原位肝移植的成功，标志着我院肝胆外科中心已熟练掌握了此项新技术。

（西南医院　供稿）

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