

应用抑制性消减杂交技术鉴定母鼠铅暴露后代海马差异表达基因

李守明¹ 刘昌英² 谢国秀² 周明² 刘志勇²

(1. 江西省儿童医院儿童保健科; 2. 江西省劳动卫生职业病防治研究所毒理研究室, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的 筛查和鉴定与铅暴露相关的海马回中差异表达基因,为鉴定学习和记忆障碍相关基因提供理论基础。方法 母体铅暴露后子代学习记忆障碍的幼鼠脑海马提取 RNA,采用抑制性消减杂交技术,鉴定母鼠铅暴露后代海马差异表达基因。结果 构建了1个近200个克隆的差减文库,测序表明得到有效克隆93个,并从中克隆和鉴定了母鼠铅暴露致学习和记忆能力显著下降的幼鼠中的海马中差异表达的基因,共43种不同的基因以及4种未知功能基因。结论 在铅暴露造成幼鼠海马中明显上调的基因包括一些已知的看家基因编码蛋白和一些与细胞蛋白折叠、信号传导、应激响应及DNA甲基化相关功能的蛋白。这些蛋白可能与幼鼠学习、记忆能力的显著降低直接相关。
[中国当代儿科杂志,2010,12(10):820-824]

[关键词] 抑制性消减杂交; 铅暴露; 学习记忆; 差异表达; 幼鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0820-05

Suppression subtractive hybridization for the identification of differentially expressed genes in the hippocampus of the offsprings of lead exposed female rats

LI Shou-Ming, LIU Chang-Ying, XIE Guo-Xiu, ZHOU Ming, LIU Zhi-Yong. Department of Child Health Care, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China (Liu Z-Y, Email: liuzhiyong0791@163.com)

Abstract: Objective To screen and identify differentially expressed genes in the hippocampus of the offsprings of lead exposed female rats in order to provide a theoretical basis for identifying learning and memory deficits related genes. **Methods** RNA was extracted from the hippocampus of young rats with learning and memory deficits due to maternal lead exposure. Suppression subtractive hybridization was used to identify the differentially expressed genes in the hippocampus. **Results** An effective subtracted library was constructed which consisted of approximately 200 clones. Sequencing for the library identified 93 clones harboring insertion fragments which included 43 different genes and 4 unknown genes. These genes might be related to learning and memory deficits due to maternal lead exposure. **Conclusions** The up-regulated genes in the hippocampus of young rats from pregnant rats under lead exposure include some housekeeping genes and some proteins involved in cellular protein folding, signal transduction, stress response and DNA methylation. These proteins might be directly related to a significant reduction in learning and memory abilities in the young rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(10):820-824]

Key words: Suppression subtractive hybridization; Lead exposure; Learning and memory; Differential expression; Young rats

学习和记忆为两种不同而又密切联系的神经生物学活动,是大脑的重要功能。研究发现,大脑是铅的重要靶器官之一,虽然铅转移至脑的速度比至其他器官慢78~800倍,但仍有相当多的铅会通过血脑屏障进入大脑,而且在影响学习记忆的重要中枢—海马回的铅浓度最高。“宫内铅暴露”不但会引起早产、低出生体重和流产、死胎等围产期病理状

态^[1],还可引起出生后儿童的智能发育障碍。回顾性研究表明,血铅水平与智商存在负相关关系^[1-2]。因此筛查和鉴定铅暴露影响的基因有助于揭示海马回中铅易感基因,特别是学习和记忆相关基因。

本研究首次在国际上应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization,SSH)技术筛选围产期铅暴露后代大鼠和正常大鼠之间的差异表达

[收稿日期]2010-01-09;[修回日期]2010-02-17
[作者简介]李守明,女,本科,副主任医师。
[通信作者]刘志勇,研究员。

基因,寻找和确定围产期铅暴露后代的障碍相关靶标基因,从而为铅暴露影响学习和记忆提供更多的理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠 20 只,由上海 B. K 实验动物有限公司提供[生产许可证号 2003-00002]。饲养于屏障环境中[使用许可证: SYXK(赣)-2003-0003]。饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供[生产许可证号: SCXK(京) 2005-0007];饮水经 121℃ 高压灭菌 30 min。

1.2 仪器和试剂

低温超速离心机(德国, Sigma 公司), TGL-16G 型高速离心机, UV300 紫外分光光度计(英国), Biometra Tl PCR 仪, BiO-RAD 电泳仪, DYCp-31D 型电泳槽(北京六一仪器厂), 德国 GFL 振荡水浴箱, 美国 ChemImager 5500 电泳凝胶成像系统, HZQ-100 振荡培养箱(哈尔滨东联电子技术公司), 37℃ 恒温培养箱。

蛋白酶 K 及 Tris 饱和酚为 Sigma 公司产品, RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 产品, Poly(A⁺) Tract mRNA Isolation System 试剂盒为 Promega 产品, PCR Purification kit 为 Takara 产品, PCR-Select cDNA subtraction 试剂盒为 Clontech 产品, pMD 18-T Vector、大肠杆菌 JM109、X-gal, IPTG 为 Takara 产品。醋酸铅(上海试剂四厂, 批号: 030107) 使用前用蒸馏水配成相应浓度备用。

1.3 实验分组

20 只雌性大鼠受孕后分为实验组和对照组($n=10$), 实验组自受孕后即给予醋酸铅每日 240 mg/kg 口服直至仔鼠断乳, 共染铅 42 d。

1.4 学习记忆能力测试

采用 Morris 水迷宫法测试幼鼠学习记忆能力^[3]。在一直径为 1 m、高 0.5 m、水深 30 cm、内壁为黑色的圆形水池中, 按空间划分为 I、II、III、IV 四个象限, 将一直径为 11 cm 的平台固定于第 I 象限, 水池水装至平台上 1 cm, 水温控制在 22~25℃。

定位航行试验(place navigation): 选取 20 d 的幼鼠 20 只(实验组, 对照组各 10 只) 进行实验。试验开始先将幼鼠放入水池中(不放平台) 自由游泳 2 min, 使其熟悉迷宫环境。试验共历时 7 d, 每天定于固定时间段(blocks) 训练。训练开始时, 将平台置于 I 象限, 从池壁 4 个起始点的任一点将大鼠面

向池壁放入水池。自由录像记录系统记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期, escape latency) 和游泳路径, 4 次训练后即将大鼠分别从 4 个不同的起始点(不同象限) 放入水中。大鼠找到平台后或 120 s 内未找到平台(潜伏期记为 120 s) 则由实验者将其拿上平台, 在平台上休息 15 s, 再进行下一次试验。每日以大鼠 4 次训练潜伏期的平均值做为大鼠当日的学习成绩。

空间探索试验(spatial probe): 第 8 天撤除原平台, 将大鼠任选 1 个入水点放入水中, 所有大鼠必须为同一入水点, 记录大鼠在 2 min 内跨越原平台(虚拟平台) 的次数和第一次穿越该平台的时间, 并记录其在 4 个象限中停留的时间作为空间记忆能力。

1.5 SSH 实验方法

1.5.1 随机选取围产期实验组母鼠所生幼鼠 10 只(20 日龄, 每窝 1 只), 快速断头取脑后分离海马核团, 按 Trizol 法提取总 RNA 后, 用 Poly(A⁺) Tract mRNA Isolation System III 试剂盒纯化 mRNA, 通过 Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计和 1.2% 琼脂糖甲醛变性电泳对 mRNA 分别进行定量和定性分析。于 -70℃ 保存。获得的 mRNA 用于构建差减文库。

1.5.2 双链 DNA 合成与 RsaI 酶切按 PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, Cat. No. 637401) 试剂盒操作手册进行。将 2.5 μ L (1.5 μ g) mRNA 与 cDNA 合成引物混合, 70℃ 退火结合 2 min, 在 200 U 反转录酶的作用下, 42℃ 延伸 1.5 h。立刻加入 dNTP mix, 20 $\times$ enzyme cocktail 组成 80 μ L 反应体系, 16℃ 孵育 2 h 后, 加入 6 U T4 DNA 聚合酶, 16℃ 反应 30 min 后, 合成 cDNA 第二链。将双链 cDNA 43.5 μ L 经 15 U RsaI 37℃ 酶消化 1.5 h, 饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1) 和氯仿: 异戊醇(24:1) 各抽提 1 次后, 80% 乙醇沉淀酶切产物, 并溶于 5 μ L 无菌水中。

1.5.3 两种接头的连接及其效率分析 实验组 cDNA 在 T4 DNA 连接酶(400 U/ μ L) 的作用下, 分别与接头 1 和 2R 在 16℃ 下连接 17 h, 加 1 μ L 0.2 mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应, PCR 检测连接效率, 即完成 Tester cDNA 的制备。

1.5.4 两次差减杂交 检验实验组接头连接率 >25% 后, 将接头 1 和 2R 连接的实验组 cDNA 1.5 μ L 分别与对照组的接头 cDNA 充分混合后, 加入 10 μ L 石蜡, 在 68℃ 下孵育 9 h。立即将两组经过第 1 次杂交的体系混合, 另加 98℃ 15 min 变性的对照组 cDNA 1 μ L 68℃ 孵育 18 h, 用 100 μ L 的稀释缓冲液稀释杂交产物。

1.5.5 巢式 PCR 扩增 取 2 μL 稀释杂交产物,在 50 $\times$ Advantage cDNA Poly-merase Mix 的作用下,以接头 1 和 2R 的共同内侧序列为引物,进行第一次 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 3 μL 第一次 PCR 产物,用 27 μL 无菌水稀释后,作为第 2 次 PCR 反应的模板,并以接头 1 和 2R 的外侧序列引物,进行第 2 次 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,20 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5.6 cDNA 消减文库消减效率分析 取消减杂交的实验组的第 2 次 PCR 产物和未消减杂交的实验组的第 2 次 PCR 产物为模板,分别加入 β -actin 基因的上下游引物,反应体系为 30 μL ,分别在 18,23,28,33 个循环结束时取 5 μL PCR 产物,1% 琼脂糖凝胶电泳分析消减有效效率。

1.6 cDNA 消减文库的构建

1.6.1 PCR 产物的 T-A 克隆 应用 pMD18-T Vector 试剂盒,按说明书进行。取 1 μL 第 2 次 PCR 产物与 1 μL 的 pMD18-T Vector 混合,加入 3 μL 无菌水,在 5 μL 连接缓冲液的作用下,16 $^{\circ}\text{C}$ 循环水浴连接 18 h。取 5 μL 连接反应产物与 100 μL 感受态大肠杆菌 JM109 混合,进行转化,转化子涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 X-gal/IPTG 琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h,随机挑取白色克隆,分别接种于 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 增菌后 900 μL 菌液加入 100 μL 灭菌甘油,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存,即得到差减 cDNA 的质粒文库。

1.6.2 阳性克隆的测序与及分析 取阳性克隆菌液 1 μL 为模板,用巢式引物 1 和 2R 为引物,进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳分析确认有插入片断后,送上海生物工程公司以 M13 引物进行测序。测序结果用 Primer premier 5.0 分析后,在 Genbank 中进行同源性分析。

1.7 RT-PCR 检验差异表达的基因

将用于构建差减文库的实验组以及对照组的组织提取总 RNA,并逆转录得到 cDNA 并作为 RT-PCR 的模板。用 β -actin 基因引物扩增逆转录合成的 cDNA:25 μL 反应体系中加入 1 μL 稀释的逆转录产物为模板,按 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 的循环参数进行 PCR。根据条带的亮度,以确定试验组和对照组各个样品的稀释倍数,使得 RT-PCR 时各样品的模板量基本相当。然后用基因特异的上游和下游引物进行 PCR,以检测上述 SSH 筛选得到的相关基因在实验组以及对

照组的组织中是否为差异表达。

1.8 统计学分析

所有数据采用 SPSS 11.5 软件分析和处理,结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均数间比较采用 one-way ANOVA 进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠学习记忆能力测试

2.1.1 20 日龄幼鼠的定位航行实验结果 通过图 1 可知,大鼠在孕期和哺乳期铅暴露可导致 20 日龄后代幼鼠的定位航行能力受到明显影响。随着训练时间的增加,对照组的幼鼠逃避时间显著缩小,而实验组幼鼠的逃避时间并没有显著的减少,与对照组比较差异有统计学意义。

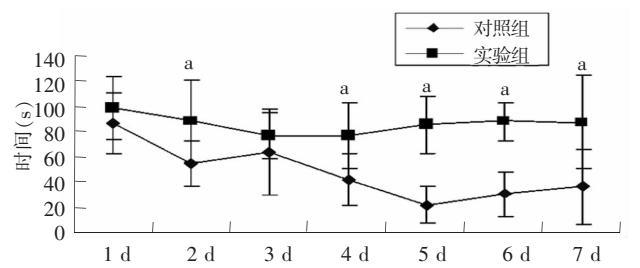


图 1 幼鼠的定位航行 (逃避潜伏时间) 实验结果
a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.1.2 20 日龄幼鼠的空间探索实验结果 在训练 7 d 后进行空间探索测试,发现对照组幼鼠搜寻平台的时间明显较实验组快,在第 I 象限停留的时间比实验组要多,差异有统计学意义 (图 2)。穿越平台的次数也显著高于实验组 ($P < 0.01$)。

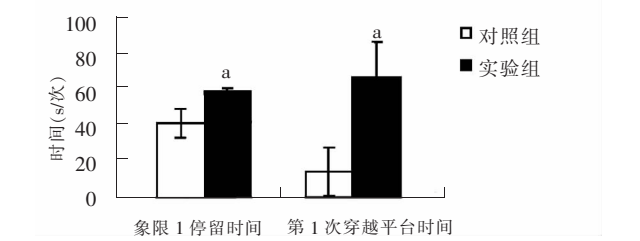


图 2 幼鼠的空间探索实验结果 a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 总 RNA 的定性和定量分析

紫外分光光度仪 (NanoDrop ND1000) 检测显示实验组和对照组幼鼠海马的总 RNA 浓度分别为 1.56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 1.42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, OD260/OD280 > 1.93 。

RNA 用 1.2% 琼脂糖甲醛变性电泳可见总 RNA 为明显的 28 S 和 18 S 条带,条带亮度比值约为 2:1,且 RNA 弥散带位于 0.5 kb 以上。表明 RNA 未被降解,符合实验要求。

2.3 cDNA 两端连接率检测

双链 DNA 与接头连接效率的高低是决定抑制消减杂交成败的关键步骤。双链 cDNA 的酶切片段分别与接头 1 和 2R 连接。图 3 显示了检测实验组-1 cDNA 和实验-2 cDNA 的接头连接效率的结果。2、4 泳道是 β -actin 的上游和下游引物作 PCR;1、3 泳道用 adaptor 1 和 adaptor 2R 的共有序列的引物-PCR Primer1 以及 β -actin 的下游引物。如果接头 1 和 2R 连接到 cDNA 上,1、3 道的扩增产物将会大于 2、4 泳道的扩增产物,而且亮度不小于 1、3 产物的 25%。从图 3 可知,接头与 cDNA 的连接效率符合要求。

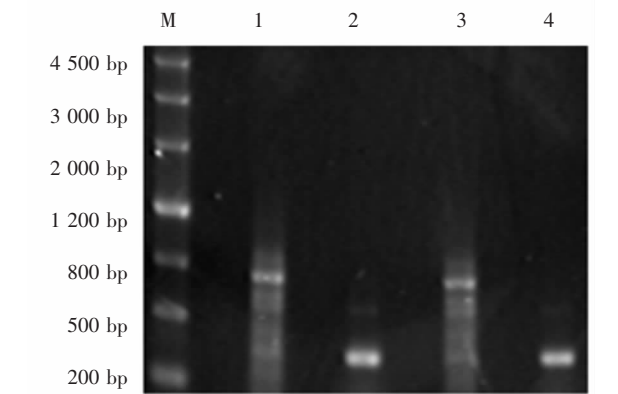


图3 PCR 检测 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA 接头连接效率 (M: Marker III 分子量标准。1 和 3:用 PCR Primer1 以及 β -actin 的下游引物进行 PCR 的产物;2 和 4: β -actin 的上游和下游引物作 PCR 的产物;1 和 2:Tester-1 cDNA 为模板;3 和 4:Tester-2 cDNA 为模板)

2.4 差减 cDNA 文库的建立

经过两轮差减杂交以及两轮 PCR 之后,在第 2 次 PCR 产物中,那些在实验组与对照组中表达没有差异基因的拷贝数已大大减少了。同样以 β -actin 作检测指标,比较它们在经过差减和未经差减杂交的 cDNA 中丰度的相差倍数,以估计差减杂交效率。以没有经过差减的 cDNA 为模板, β -actin 基因在 20 个循环就可见到明显的扩增带,而在经过差减杂交的 cDNA 中直到 35 个循环后才扩增出明显带。因此,差减杂交将免疫组中特有的 cDNA 富集了大约 215 倍。

2.5 差异 cDNA 片段的 PCR 筛选

将差减 cDNA 的第 2 次 PCR 产物与 T 载体连

接,转化大肠杆菌,得到了含近 200 个克隆的质粒文库。随机挑选 100 个克隆进行 PCR 筛选,弃阴性克隆和 PCR 产物为多条带的克隆,得到了 PCR 产物为单一条带并且插入 cDNA 片段的大小在 0.2 ~ 1.2 kb 之间的有效克隆 93 个。本研究筛选的基因包括 *Park 2*、*Map 3k10*、*Nfatc 1*、*Runx 1*、*Ddx 18*、*Ctcf*、和 *Prkdc* 等。图 4 显示了部分 PCR 筛选的结果。

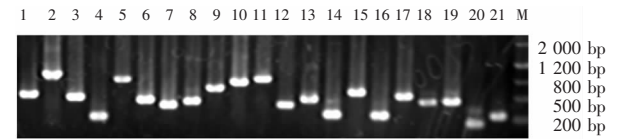


图4 PCR 鉴定感染组差减文库中 cDNA 片断的大小 (泳道 1-21:从差减文库中随机调取的 21 个克隆的 PCR 产物;M: Marker III DNA marker)

2.6 差异 cDNA 片段的序列分析

93 个阳性克隆的序列经过 BLASTX 查询后,能够找到同源基因片段的有 89 个,未找到任何同源性片段的有 4 个。这 89 个能找到同源片断的克隆编码 43 种不同的基因。在已鉴定的差减文库中 14 个基因出现重复,其中重复数最多的基因是载脂蛋白 A-I($n=8$),以及同源性很高的未知蛋白 11 个。

2.7 差异表达基因的 RT-PCR 验证

采用 RT-PCR 方法对 5 个已知同源的基因在实验组和对照组的混合组织中的差异表达进行了验证,半定量 RT-PCR 法证明这些基因在铅暴露后的大鼠海马组织中表达是上调的,见图 5。

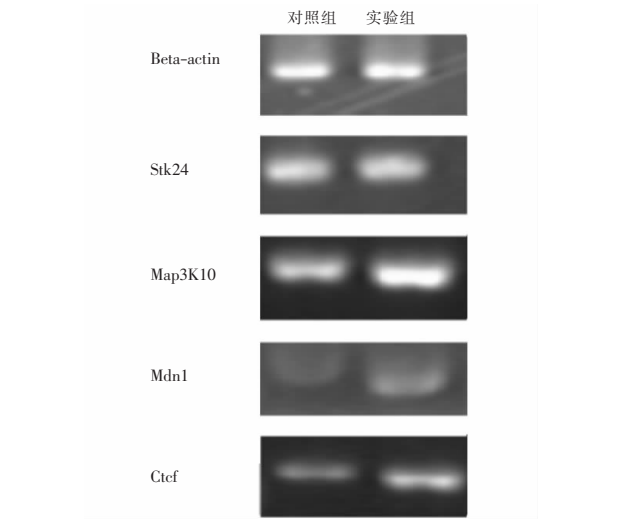


图5 RT-PCR 测定各基因在实验组和对照组的差异表达情况

3 讨论

SSH是在代表性差异分析技术(representational difference analysis,RDA)的基础上结合抑制性PCR和消减杂交技术发展起来的一种高效分离差异表达基因的方法,具有特异性高、假阳性率低、操作简便、灵敏度高等特点。SSH能用于分析正常和异常状态下基因的表达变化,并且可用于克隆和鉴定相关差异基因,对于筛选和鉴定新的功能基因从而研究基因的表达调控有着重要的意义。目前SSH方法在心血管疾病、肿瘤医学和免疫学等各方面研究中被证明具有重要的作用,应用该技术已经成功地克隆了很多与疾病、发育相关的重要基因^[5-10]。本研究给母鼠孕期和哺乳期经铅暴露后所产子代通过Morris水迷宫检测,学习记忆能力显著下降,进一步采用SSH的方法探索了母鼠铅暴露后代海马组织中的差异表达基因。

在铅暴露造成幼鼠海马中明显上调的基因包括一些已知的看家基因和一些与细胞生长调控密切相关的基因如*Mdn1*、*Stk24*和*Taok2*等,这些蛋白与细胞蛋白折叠,调控蛋白复合体的组装,肌蛋白丝的聚合密切相关。在差减文库中鉴定出一个基因编码金属肽酶。推测机体在铅的作用下上调的金属肽酶表达水平,从而增强机体对由于重金属作用导致变性蛋白或组装不正确多肽的内切作用,发挥其抗铅污染的作用。本研究筛选到*Park2*基因,该基因在突触传递、多巴胺的代谢和神经递质的分泌调整等方面具有重要功能,从基因水平上说明铅暴露确实导致学习、记忆和行为的改变。在差减文库中还鉴定得到*Map3K10*、*Nfatc1*、*Runx1*、*Ddx18*和*Prkdc*等基因。这些基因在海马组织中的上调说明铅在该组织中影响广泛,因为这些基因编码了与信号传导相关的蛋白质激酶、ATP结合蛋白、依赖钙调蛋白的磷酸

酯酶的和磷酸转移酶等。另外,本研究在差减文库中筛选到*Ctcf*基因。该基因与DNA结合、DNA甲基化、应激响应以及维持DNA甲基化有密切关系。

本实验结果表明,母鼠铅暴露影响了后代幼鼠海马中许多跟应激反应、信号传导和蛋白翻译/折叠相关功能的蛋白,这些蛋白可能与幼鼠学习、记忆能力的显著降低直接相关,为今后铅暴露的信号传导以及对学习、记忆能力的调控和影响机制打下了基础。

[参 考 文 献]

[1] 樊福成. 出生前铅暴露的研究[J]. 国外医学卫生学分册, 2002,29(2):87-92.

[2] 谢寒芳,颜崇淮. 铅影响学习记忆的分子神经生物学机制研究进展[J]. 国外医学儿科学分册,2005,32(4):240-243.

[3] 王丽. 儿童铅中毒(上篇)[J]. 中国当代儿科杂志,2007,9(5):514-516.

[4] 杨毅飞. 游泳训练对大鼠空间学习记忆能力及脑内相关基因的影响[D]. 华东师范大学,2006.

[5] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12):6025-6030.

[6] 文建军,谢京,刘世贵,杜建芳. 一种新的天然雌核发育银鲫完全成熟卵母细胞特异表达基因-FSTRAP的克隆与表达分析[J]. 中国科学,2001,31(4):343-352.

[7] Xie J, Wen J, Yang ZA, Wang HY, Cui JF. Cyclin A2 is differentially expressed during oocyte maturation between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp[J]. J exp Zool, 2003, 295(1):1-16.

[8] 胡国库,张义正,庞岚,文建军. 性逆转石斑鱼脑垂体差异表达基因克隆的筛选[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(6):59-62.

[9] 冯晨,付伟,赵咏梅,陈菲,宗志宏,于秉治. PKC- α 和PKC- δ 在不同发育阶段小鼠睾丸中的差异表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2002,18(6):780-782.

[10] 陈忠斌,杨静,王华,孙偶军,王升启. 应用消减杂交技术筛选流感病毒感染宿主应答基因[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2003,19(2):156-161.

(本文编辑:王庆红)