

# 小肠 RNA 对小鼠电离辐射肠道损伤 修复的差异基因表达的研究 \*

崔大祥<sup>1</sup> 曾桂英<sup>2</sup> 王枫<sup>1</sup> 田芙蓉<sup>2</sup>  
闫小君<sup>1</sup> 任东青<sup>2</sup> 赵涛<sup>2</sup> 苏成芝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(第四军医大学全军基因诊断技术研究所 西安 710032)

<sup>2</sup>(第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

**摘要** 为从基因水平探讨小肠核糖核酸, 促进小鼠电离辐射肠道损伤修复的机理, 采用随机分组法把 90 只小鼠分成 4 组, 建立辐射后给予 40 $\mu$ g RNA 治疗的实验组与 0.4mL 生理盐水治疗的对照组模型, 分别于照射后 6、12、24h, 4d 和 8d 采集小肠空肠段标本, 运用消减杂交基础上的 LD-PCR 技术, 分离实验组与对照组之间的差异表达基因。结果表明; 实验组与对照组 6、12、24h, 4d 和 8d 的消减后 LD-PCR 产物克隆成功, 共获取 165 个新克隆, 其中实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 18、22、25、13 和 12 个, 编号依次为 XCZ1-90, 即为 90 个与注入 RNA 修复密切相关的高表达基因; 对照组 6、12、24h, 4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 22、25、14、6 和 8 个, 编号为 AXCZ1-75, 即为 75 个可能与电离辐射损伤相关的高表达基因。本工作成功地建立了辐射后给予 RNA 治疗的实验组与生理盐水治疗的对照组模型; 从实验组与对照组之间分离并克隆了 165 个新基因, 其中 90 个与注入 RNA 修复密切相关的高表达基因, 75 个可能与电离辐射损伤相关的高表达基因。

**关键词** 小鼠, 辐射, 损伤, 修复, 表达基因, 消减杂交, 长距离-PCR

**中图分类号** R827.3

外源核酸 (RNA, DNA) 对受照射小鼠肠腺损伤的恢复作用见文献 [1~3] 报道。本工作首先建立辐射后给予 RNA 治疗与生理盐水对照治疗的模型, 采集肠组织标本后采用消减杂交基础上的 LD-PCR 技术, 观察外源小肠 RNA 对受照射小鼠损伤修复的差异基因表达, 为进一步研究电离辐射对小鼠肠道损伤的修复机理奠定基础。

## 1 材料和 方法

### 1.1 材料

mRNA 提取采用 Promega 公司 PolyATtract System 1000 试剂盒, 反转录采用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech), PCR 产物纯化试剂盒采用 Promega 公司 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System, LD-PCR 采用 Advantage 2 PCR Kit (Clontech); PCR 扩增仪采用 PE-5700 型定量 PCR 仪, pGEM-T easy Vector Systems 购自 Promega 公司,  $\gamma$ -32p dATP 购自北京福瑞公司, 其它化学试剂购自北京原平公司。

\*211 工程专项经费资助 (98X207)

收稿日期: 初稿 1999-11-01, 修回 1999-12-30

## 1.2 方法

1.2.1 小肠总 RNA 的提取 按文献 [1] 的方法从 LACA 正常小鼠小肠中提取总 RNA: 即取正常 LACA 雄性小鼠的小肠, 用冷生理盐水冲洗净肠内容物, 滤纸吸干, 剪碎并称重, 用盐酸胍-苯酚-氯仿抽提, 异丙醇沉淀 RNA, 75% 乙醇洗涤。提取的 RNA 溶于经 DEPC 处理的水中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待用。提取的 RNA 用紫外分光光度计进行光密度扫描, 其吸收峰在 260nm 处, 为典型的核酸吸收光谱, 求得  $A_{260}/A_{280}$  的比值为 1:810, 用呈色法检测, 提取的 RNA 中不含 DNA 和蛋白质。

1.2.2 动物模型的制备 第四军医大学动物室繁殖 BALB/C 雄性小鼠 90 只, 10-12 周龄, 体重为 18-22g, 实验前于实验室内饲养 2 周以适应环境。照射前根据随机数字表将小鼠按体重随机分成 4 组, 用 0.5% 戊巴比妥钠 ( $40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重) 麻醉, 固定于有机玻璃照射盒内, 以  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线进行腹部 1 次照射。剂量率为  $151.13\text{cGy}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $149.47\text{cGy}\cdot\text{min}^{-1}$ , 照射剂量为 1150cGy)。照射时, 除小鼠腹部外, 躯体的其余部位用 5cm 厚的铅块屏蔽, 照射源至动物中心的距离为 1.7m。

1.2.3 小鼠 RNA 的注入 实验当天, 用冷无菌生理盐水将小肠 RNA 稀释成浓度为  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的注入液。小鼠接受照射后 2h 内, 采用局部肠腔扩张注入法 [4] 给实验组每只小鼠局部空肠腔内注入 0.4mL ( $40\mu\text{g}$ ) 的小肠 RNA 注入液, 此外, 每组中 5 只小鼠三角肌注射 0.4mL ( $40\mu\text{g}$ ) 小肠 RNA 注入液, 照射对照组于局部肠腔内只注入 0.4mL 的生理盐水。实验后, 小鼠常规饲养。

1.2.4 样品的制备 分别于照射后 6、12、24h, 4d 和 8d 采用颈椎脱臼法活杀小鼠, 快速取出小肠空肠段组织, 同样条件的放到一起, 用生理盐水冲洗净内容物,  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存待处理。样品分成 4 组: IR 示照射后肌注 RNA 组; IRNA 示照射后局部肠腔注入 RNA 组; IS 示照射后注入生理盐水组; N 示正常对照组。

第 1 组: 1 9901-IRNA-12h, 2 9901-IS-12h, 3 9901-N, 4 9901-IS-8d, 5 9901-IRNA-8d。

第 2 组: 1 9902-IS-8d, 2 9902-IRNA-8d, 3 9902-IR-8d, 4 9902-IS-1d, 5 9902-IR-1d。

第 3 组: 1 9903-IRNA-6h, 2 9903-IS-6h, 3 9903-IRNA-4d, 4 9903-IS-4d, 5 9903-IRNA-4d

第 4 组: 1 9904-IRNA-6h, 2 9904-IS-6h, 3 9904-IR-6h, 4 9904-IS-8d, 5 9904-IRNA-8d,  
6 9904-IR-8d。

1.2.5 标本的 mRNA 提取并定量 实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的小肠标本为了避免个体差异, 相同条件的标本混合在一起, mRNA 提取采用 Promega 公司 PolyATtract (System 1000 试剂盒, 按说明书提取, 提取的 mRNA 用紫外扫描定量。

1.2.6 mRNA 反转录 mRNA 反转录采用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech), 按说明书进行。

1.2.7 实验组与对照组相互消减杂交 各取实验组与对照组 mRNA  $0.1\mu\text{g}$ , 加入 Biotinylated Oligo(dT)Probe ( $50\text{pmol}/\mu\text{L}$ ),  $70^{\circ}\text{C}$  5min, 然后各自加入到 IS 组与 IR 组 cDNA 第一链中, 加入相应杂交液, 于  $42^{\circ}\text{C}$  杂交过夜 24h, 加入 Streptavidin MagneSphereParticles 适量, 混匀后, 用磁架去除双链杂交产物, 重复 2 次, 上清用异丙醇沉淀, 回收的 cDNA 第一链各溶于  $10\mu\text{L}$  三蒸水中。

1.2.8 LD-PCR 扩增 取回收 cDNA 第一链产物  $10\mu\text{L}$  作模板, 依次加入 PCR-Grade Water  $74\mu\text{L}$ ,  $10\times$  advantage 2 PCR buffer  $10\mu\text{L}$ ,  $50\times$  dNTP Mix  $10\mu\text{L}$ ,  $50\times$  advantage 2 Polymerase Mix  $1\mu\text{L}$ , PCR Primer Mix  $2\mu\text{L}$ ,  $50\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$   $3\mu\text{L}$ , 混匀后, 离心数秒, 采用  $95^{\circ}\text{C}$  1min,  $95^{\circ}\text{C}$

15s, 68 °C 6min, 30 个循环, 最后在 68 °C 延伸 6min。取 10 $\mu$ L 产物进行 1.2% 琼脂糖电泳鉴定。

**1.2.9 PCR 产物纯化与克隆** PCR 产物用 Promega 公司 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System 纯化试剂盒按说明书纯化, 溶于 10 $\mu$ L 水中。按说明书把 PCR 产物克隆入 pGEM T easy Vector 载体, 转化 JM109 菌, 挑选克隆, 过夜培养, 提取质粒, 用 BstZ1 酶切证实有无插入片段。

**1.2.10 Northern 杂交** 酶切产物采用末端标记法在末端标记上  $\gamma$ -32P dATP 作探针, 对实验组与对照组 mRNA 进行 Northern 杂交。

## 2 结果

### 2.1 消减杂交后 LD-PCR 结果

实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的小肠标本相互消减杂交后产物 LD-PCR 扩增全部成功, 片段大小集中在 1-2kb 左右 (见图 1)。



Fig.1 Result of 1.2% agarose gel electrophoresis of LD-PCR products No.1,3,5,7,9 were products of test group in 6h, 12h, 24h, 4d, 8d; No.2, 4, 6, 8, 10 were products of control group

### 2.2 产物克隆与酶切鉴定结果

实验组与对照组 6、12、24h, 4d 和 8d 的消减后 LD-PCR 产物酶切后证实克隆成功 (见图 2), 共获取 165 个新克隆, 其中实验组 6、12、24h, 4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 18、22、25、13、12 个, 编号依次为 XCZ1-90, 即为 90 个与注入 RNA 修复密切相关的高表达基因; 对照组 6、12、24h, 4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 22、25、14、6 和 8 个, 编号为 AXCZ1-75, 即为 75 个可能与电离辐射损伤相关的高表达基因。

### 2.3 部分克隆基因 Northern 杂交结果

以克隆基因质粒作探针, 用实验组、对照组 mRNA 进行 Northern 杂交, 证实在两组之间

存在表达差异(见图3)。

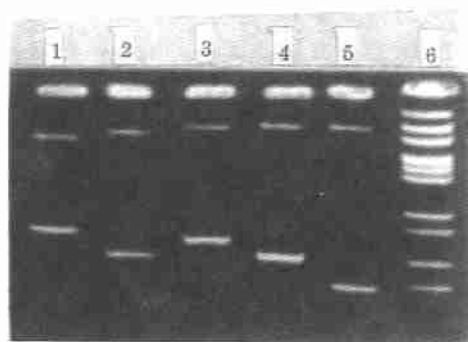


Fig.2 Identification of part products cloned in T easy vector digested with BstZ1 by 1% agarose gel electrophoresis No.1-5 were XCZ1-6 digested with BstZ1; No.6 was DNA HindIII and EcoRI Marker

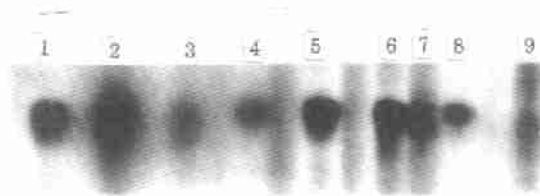


Fig.3 Part result of Northern blot using cloned products as probes 1-9 were respectively results of hybridization using cloned products as probes

### 3 讨论

消化道是电离辐射敏感组织,其中尤以小肠最为敏感。多年来,国内外对电离辐射照射后肠上皮干细胞的损伤、肠道的组织形态以及消化吸收功能的改变作了较多的研究,我们对小肠辐射损伤与修复的分子机理进行了初步探讨<sup>[1~6]</sup>,在此基础上我们对促进辐射损伤肠上皮的恢复也进行了一些研究。实验结果表明,给照射后小鼠注入 RNA 对损伤肠上皮的恢复具有较好的治疗作用,其机理存在争论。人们认为可能是补充了 DNA 修复合成的基本原料,也可能是提取的 RNA 中含有特殊的因子,能够促进损伤的肠粘膜修复<sup>[3]</sup>,但具体的分子机理并不清楚。现代分子生物学研究表明,人类基因组由 10 万左右的不同基因组成,这些基因的选择性表达决定了机体整个生命过程,基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置。因此,我们认为,照射后注入 RNA 组与照射后注入生理盐水组之间的差异表达基因,代表着与注入 RNA 治疗密切相关的表达基因,分离并克隆这些基因不仅有助于阐明核酸治疗的分子机理,而且也为进一步开展辐射损伤的基因治疗提供重要的理论依据。

本实验以 BALB/C 雄性小鼠为研究对象,采用随机分组法进行分组,共用小鼠 90 只,分 4 批进行,相同实验条件与时间点的标本混合在一起,同时设立了未照射未注入 RNA 的小鼠作正常对照。为了避免假阳性,获得全长基因,我们采用了消减杂交基础上 LD-PCR 技术<sup>[7]</sup>,共获取了 165 个新基因克隆,其中实验组 6、12、24h,4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 18、22、25、13 和 12 个,编号依次为 XCZ1-90,即为 90 个与注入 RNA 修复密切相关的高表达基因;对照组 6、12、24h,4d 和 8d 的克隆新表达基因数分别为 22、25、14、6、8 个,编号为 AXCZ1-75,即为 75 个可能与电离辐射造成损伤有关的高表达基因。部分基因的 Northern 杂交结果证实:所获基因在实验组与对照组之间存在显著表达差异。目前这些基因的具体功能仍不清楚,我们认为这些基因与电离辐射的治疗可能密切相关,只要我们阐明这些基因的功能,针对这些基因变化,设计调控措施,就完全有可能把电离辐射对胃肠道的损伤减低到最小程度,也为肿瘤放疗并发症的治疗提供了新思路。

消减杂交基础上的 LD-PCR 技术是目前获取差异表达基因全长 cDNA 的最有效途径<sup>[7]</sup>。此技术的主要优点是: 无假阳性, 可快速获取表达基因的全长 cDNA, 特别是在 LD-PCR 中采用了具自动校正功能的酶, 使实验结果更加可靠。

本文实验结果表明: 小鼠受  $\gamma$  射线照射后注入 RNA 组与照射后注入生理盐水组之间存在显著不同的基因表达, 而且在不同的时间点皆存在基因差异表达, 这些表达基因与电离辐射对肠道损伤和小肠 RNA 对损伤的修复可能密切相关。所以本研究将为进一步揭开核酸治疗胃肠辐射损伤的修复机理奠定基础。

## 参 考 文 献

- 1 Zeng G Y, Cheng B F, Liu A P *et al.* J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1993, 11(1):53-55
- 2 Zeng G Y, Han S C, Liu A P *et al.* J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1995, 13(4):233-235
- 3 Zeng G Y, Xie X J, Tian F R *et al.* J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1998, 16(4):231-232
- 4 Zhou Y K, Hang S C, Zeng G Y *et al.* J Mil Med Sci Acad (in Chinese), 1987, 11(2):88-89
- 5 Cui D X, Zeng G Y, Yan X J *et al.* World Chin J Digestol (in Chinese), 1999, 7(9):804-805
- 6 Potten C S, Hendry J H. Radiation and Gut. Elsevier Science B.V, 1995, 1-307
- 7 Cui D X, Yan X J, Su C Z. Chemi Life (in Chinese), 1999, 19(5):232-235

## DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN REPAIRING IRRADIATION-INDUCED DAMAGE IN MOUSE INTESTINAL TRACT BY FOREIGN MOUSE SMALL INTESTINAL RNA

CUI Daxiang<sup>1</sup> ZENG Guiying<sup>2</sup> WANG Fen<sup>1</sup> TIAN Furong<sup>2</sup> YAN Xiaojun<sup>1</sup>  
REN Dongqing<sup>2</sup>  
ZHAO Tao<sup>2</sup> SU Chengzhi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Chinese PLA Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

<sup>2</sup>(Department of Prevention Nucleic Weapon, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**ABSTRACT** To study the differentially expressed genes correlative to irradiation-induced damage in mouse intestinal tract and its repair by foreign mouse small intestinal RNA. Divide 90 mice into 4 groups randomly. For the experimental groups, each mouse was given 40 $\mu$ g foreign mouse small intestinal RNA, and for the control groups, 0.4mL of 0.9% NaCl. The intestinal specimens were collected from each group 6h, 12h, 24h, 4d and 8d after <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays irradiation respectively. The differentially expressed genes in the tested and control groups were checked and cloned by long-distance PCR based on subtractive hybridization. 165 differential gene clones were obtained, of which 75 named as AXCZI-75 maybe were correlated with the irradiation-induced damage in mouse intestinal tract; and 90 named as XCZI-90 maybe were correlated with repairing of the damaged mouse intestinal tract by foreign mouse small intestinal RNA.

**KEYWORDS** Mice, Irradiation, Damage, Renovate, Expressed genes, Subtractive hybridization, Long-distance PCR

**CLC** R827.3

Supported by Scientific Research Foundation of 211 Projection (98X207)