

CFTR 基因在小鼠肠道组织中的差异表达

王月影, 韩莹倩, 查光明, 汪新建, 李和平

(河南农业大学农业部动物生化与营养重点开放实验室, 郑州 450002)

【摘要】 目的 研究肠道组织 CFTR 基因表达与分泌性腹泻发生的关系。方法 选取 KM 小鼠 24 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组(每组 8 只); 对照组经小鼠腹腔注射 0.2 mL 生理盐水, 实验组小鼠经腹腔注射 LPS [6 mg/(kg·bw)] 分别作用 1 h、8 h, 于注射后通过小鼠精神状态、肠道组织形态学判定分泌性腹泻模型的建立, 利用荧光定量 PCR 法检测各段肠道组织 CFTR 基因的表达。结果 LPS 成功诱导小鼠发生了分泌性腹泻; CFTR 基因在小鼠十二指肠、空肠、回肠和结肠组织中均有不同的表达丰度, 以结肠最高, 但各段肠道间差异不显著; 与对照组相比, LPS 上调了十二指肠、空肠和回肠 CFTR 基因的转录, 下调了结肠 CFTR 基因的转录。结论 提示肠道组织 CFTR 基因转录水平的上调与 LPS 诱导分泌性腹泻的发生密切相关, 且在各肠段发挥的作用不同, 其中空肠在氯离子(Cl⁻)分泌中发挥主要作用, 结肠的作用最弱。

【关键词】 CFTR 基因; 小鼠; 肠道; 表达; 荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0049-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.011

Differential expression of CFTR gene in the mouse intestinal tissues

WANG Yue-ying, HAN Ying-qian, ZHA Guang-ming, WANG Xin-jian, LI He-ping

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition of the Ministry of Agriculture,
Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 **Object** This experiment was conducted to study the relationship between CFTR gene expression in the intestinal tissues and secretory diarrhea. **Methods** Twenty-four Kunming mice were selected, half male and half female, and were randomly divided into 3 groups (n = 8 in each group): control group with intraperitoneal injection of 0.2 mL normal saline, and the experimental group of mice by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) (6 mg/kg·bw). The mental state and intestinal morphology of the mice at 1 h and 8 h after LPS injection were observed to assess whether the secretory diarrhea model was successfully established. The expression of CFTR gene segments of intestine tissue was detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** LPS induced secretory diarrhea. CFTR gene was expressed in the mouse duodenum, jejunum, ileum and colon tissues with different expression abundance. It was highest in the colon, but the difference was not significant between intestinal segments. Compared with the control group, LPS up-regulated the transcription level of CFTR gene in the duodenum, jejunum and ileum, and down-regulated the transcription of CFTR gene in the colon. **Conclusions** The results of our study suggest that the changes of the transcriptional level of CFTR gene are closely related with the diarrhea induced by LPS and the effects in different intestinal segments on the diarrhea is different. The jejunum plays a crucial role and the colon plays a least role in the Cl⁻ secretion.

【Key words】 CFTR; Mouse; Intestine; CFTR gene expression; Fluorescence quantitative PCR

1989年 Riordan 等^[1]克隆了囊性纤维化跨膜转运调节体(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), 1991年 CFTR 被确定为氯离子选择性通道, 从而开始了对 CFTR 作为 Cl⁻通道的系

[基金项目] 农业部 948 重点计划(2011-G35); 河南省重点科技攻关(112102310705)

[作者简介] 王月影(1972年-), 女, 副教授。E-mail: wangyueying2008@126.com

[通讯作者] 李和平。E-mail: liheping1972@126.com

统研究。CFTR 分布广泛,诸如肠道、肺、肝、胰腺、生殖腺等的细胞均有表达^[2]。CFTR 是受 cAMP 激活的 Cl⁻ 通道蛋白,是 ATP 结合转运体超家族的一名特殊成员,由五个结构域组成:两个跨膜结构域,两个核苷酸结合域和一个特殊的调控域^[3,4]。

CFTR 通过支架蛋白与其他膜受体以及蛋白激酶、磷酸酶形成大分子信号复合体,在复杂的细胞信号系统参与下,CFTR 的功能活动在时间和空间上得到精确的调控^[1]。CFTR 是决定上皮细胞跨膜盐分的运输、液体流动和离子浓度的中心。CFTR 在肠、胰腺和汗腺的水和电解质分泌中发挥关键作用,参与汗腺导管和呼吸道上皮细胞液体和电解质的吸收^[5],研究表明 CFTR 缺陷的动物表现人类囊性纤维化病的许多特点,如呼吸道 Cl⁻ 转运和黏膜下层腺体分泌障碍,胰腺、肝脏和输精管疾病,早期肺部感染等^[6]。CFTR 缺陷的猪表现为胃肠道异常和某些方面的肺部疾病,如胎粪性肠梗阻,所有新生 CFTR 缺陷小猪患有肠梗阻,胆囊发育受阻^[7]。CFTR 活性过高会引发分泌性腹泻等疾病,且内毒素诱导的腹泻与 CFTR 活性升高密切相关^[8]。目前已经利用分子生物学技术发现能特异阻断 CFTR 通道的抑制剂,极有可能成为新型的抗分泌性腹泻药物。

肠道不仅是营养物质消化、吸收的器官,也是机体重要的保护性屏障。肠黏膜是机体抵抗外源物质及微生物的重要免疫屏障,同时也是全身器官的“受损门户”,肠源性感染可能会导致机体多脏器功能衰竭。因此,完整的肠黏膜及其免疫系统在抵抗病原微生物感染中具有重要的作用。腹泻主要是由于肠上皮细胞对离子及溶质的吸收与分泌平衡产生紊乱,随后伴随大量水进入肠管并刺激肠蠕动增加所引起。通常,这种平衡紊乱是由于细菌分泌毒素损伤上皮细胞结构而造成的。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是革兰阴性菌细胞壁的成分,在正常及病理情况下主要通过胃肠道进入体内,可使人 and 动物出现腹泻等应激反应^[7,9],诊治延误常出现致死病例。

多年来通过对 CFTR 通道结构与功能的研究,人们对 CFTR 通道的门控机制及活性的调节有了深入的认识。但对于发生腹泻时不同肠段 CFTR 基因表达研究尚少,因此本实验利用 LPS 建立动物分泌性腹泻模型,阐明 CFTR 基因在不同肠段的表达差异,初步探讨腹泻时 CFTR 基因表达的变化,为进一

步以 CFTR 为作用靶点进行分泌性腹泻治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及实验设计

选取 2 月龄 SPF 级 KM 小鼠 24 只(雌雄各半),且不存在肠先天性离子交换缺陷,体重(50 ± 5)g,购自河南省实验动物中心[SCXK(豫)2005-0001],实验在农业部动物生化与营养重点开放实验室进行。在 12 h 光照和 12 h 黑暗的条件下喂养,饲喂小鼠全价颗粒饲料,环境温度 20 ~ 25℃,自由采食和饮水。随机分为:对照组(0 h)、注射 LPS 1 h 组(1 h)、注射 LPS 8 h 组(8 h),每组 8 只。1 h 和 8 h 组小鼠分别经腹腔注射 6 mg/(kg·bw) LPS(方法参考文献[8]),于注射后 1 h 和 8 h 采集组织样品;对照组小鼠经腹腔注射等量的生理盐水,于注射后 8 h 采集组织样品;注射后随时观察记录小鼠精神、食欲、毛色、粪便(外观形状、颜色、气味等)、死亡状况等。若小鼠精神萎靡、少动或激惹躁动,大便性状为黏液、稀便则视为造模成功^[10]。

1.2 仪器及试剂

1.2.1 主要试剂

大肠杆菌 LPS(Sigma, O55: B5), RNAiso Plus、dNTP、M-MLV reverse transcriptase、random primer、MLV、SYBR green、CFTR 引物来自 TaKaRa 公司, DNase、DNase buffer、stop solution 来自 Promega 公司,其他普通试剂均为分析纯。

1.2.2 主要仪器

高速冷冻离心机(Eppendorf, Germany);高速组织匀浆机(IKA, 广州仪科);Gel Doc-It imaging System 凝胶成像系统(UVP, USA);荧光定量 PCR 仪(Eppendorf, Germany);微量分光光度计(Thermo Scientific 公司);莱卡切片机;Motic 显微镜及成像系统等。

1.3 肠道组织采集

实验结束后,用 10% 水合氯醛 0.35 ~ 0.4 mL/(100 g/bw)经腹腔麻醉小鼠,麻醉后打开腹腔,分别取十二指肠、空肠、回肠、结肠组织置液氮速冻, -80℃ 保存待测,另取一段十二指肠置 4% 多聚甲醛进行固定,用做石蜡切片。

1.4 实验方法

1.4.1 肠道组织病理变化

取固定 24 h 的小鼠肠道组织经过冲水,梯度酒

精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋等处理后,以 5 μm 的厚度切片,常规苏木素-伊红(H. E)染色,显微镜观察成像。

1.4.2 肠道组织 CFTR 基因的表达

以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为看家基因,采用荧光定量 PCR 法测定小鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠中 CFTR 基因的转录水平。

(1) PCR 引物的设计及合成

根据 GenBank 中 GAPDH 和 CFTR 的 mRNA 序列,设计 GAPDH 的引物序列:F: tgcaccaccaactgettag, R: gatgcaggatgatgttc,扩增子 175 bp;CFTR 的引物序列:F: tgaacacagga tagaagcgatgttg, R: ggagctaatggcctgctgga,扩增子 130 bp。引物由 TaKaRa 公司合成。

(2) 肠道组织总 RNA 提取及 cDNA 合成

小鼠肠道组织总 RNA 的提取按 RNAiso Plus 说明书进行,微量分光光度计检测 RNA 纯度和浓度, -80°C 保存。cDNA 合成参考 M-MLV 说明书进行。

(3) 荧光定量 PCR

单个样品的 CFTR 基因均作 3 孔重复以减少实验误差,每个样品均有看家基因 GAPDH 作为对照。PCR 反应体系为:SYBR green mix 5 μL ;上下游引物(20 pmol/ μL)各 0.1 μL ; nuclease-free water 3.55 μL ; Total 10 μL 。反应程序为: 95°C 2 min, 95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 20 s, 40 个循环。荧光信号采集设置在 PCR 反应延伸阶段,阈值及基线采取软件自动生成。扩增程序设置之后,插入熔解曲线反应程序,具体程序为: 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s。

(4) 荧光定量 PCR 数据分析

以 GAPDH 基因作为内参基因,分别用对照组肠道组织和十二指肠组织的 mRNA 表达量作为对照,通过公式计算实验组和各肠段组织中 CFTR 基因相对表达量: $\text{Ratio} = E_{\text{target}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})} / E_{\text{reference}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}$, 其中 ratio 为 mRNA 相对表达量; E_{target} 为目的基因扩增效率; $E_{\text{reference}}$ 为内参基因扩增效率, $\text{Ct}_{\text{control}}$ 为对照组的 Ct 值, $\text{Ct}_{\text{sample}}$ 为样品组的 Ct 值。对 mRNA 相对表达量采用 SPSS 13 统计软件分析处理,组间差异比较用 F 检验。

2 结果

2.1 小鼠的活动特征

实验过程中,对照组小鼠精神良好,饮食、毛色、

排便情况均正常;LPS 注射后 1 h 和 8 h 后小鼠出现不同程度的腹泻,部分小鼠出现松软大便、黏液便、稀便,精神萎靡、行动迟缓,采食量有所下降。提示 LPS 成功地诱导小鼠发生了分泌性腹泻。

2.2 小鼠肠道组织病理学变化

小鼠肠道组织病理学变化见图 1(彩插 8)。由图 1 可知,对照组小肠黏膜基本正常,绒毛排列基本整齐,部分固有层、黏膜下层轻度水肿,肠腺正常。LPS 注射组小肠绒毛呈现损伤,部分顶部绒毛脱落,上皮间隙扩大,肠腺不同程度的损伤,固有层、黏膜下层呈现中度至高度水肿,出现炎症细胞浸润,毛细血管充血,淋巴管扩张。LPS 注射 1 h 后,黏膜及绒毛排列轻度紊乱,绒毛缩短,无黏膜变性、坏死,出现上皮细胞下间隙增大,肠腺轻度受损,毛细血管充血;注射后 8 h,小肠绒毛明显水肿,绒毛排列紊乱,绒毛黏膜糜烂脱落,肠腺受损,毛细血管发生明显充血,有炎症细胞浸润。

2.3 CFTR 的荧光定量 PCR 检测结果

CFTR 的荧光定量检测结果见图 2(彩插 8)。由图 2 可知,该组样品中溶解曲线均较集中,出现一个溶解曲线高峰群,基本上没有杂峰出现,说明 CFTR 基因浓度较纯正,基本上没有其他杂物基因出现。这些样品基因中溶解高数值不同,说明不同腹泻时间 CFTR 在不同部位的表达量不同。

2.4 各肠段中 CFTR 基因的转录水平

各肠段中 CFTR 基因的转录水平见图 3。由图 3 可知,小鼠十二指肠、空肠、回肠和结肠中均有 CFTR 基因的表达,且各肠段的表达丰度不同,以结肠表达量最高,其次是回肠、十二指肠,空肠表达量最低。CFTR 在各肠段表达的差异提示,各肠段在依靠 CFTR 转运和分泌 Cl^{-} 方面有差异。

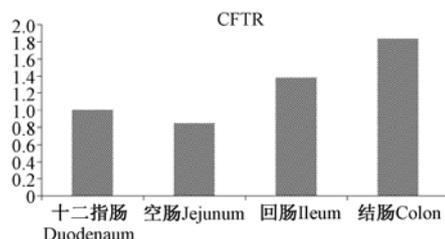


图 3 CFTR 基因在各肠段中的转录水平

Fig. 3 Transcription level of CFTR gene in the intestinal segments

2.5 LPS 对小鼠各肠段中 CFTR 基因转录水平的影响

LPS 对小鼠各肠段中 CFTR 基因转录水平的影

响见图 4 和表 1。由图 4 和表 1 可知,注射 LPS 后,十二指肠、空肠和回肠的 CFTR 基因转录水平均发生上调,且随 LPS 作用时间的延长,十二指肠 CFTR 基因转录水平显著上调,空肠和回肠的 CFTR 基因转录有所下调,但仍高于对照组,而结肠 CFTR 基因转录水平的变化恰好相反,随注射时间的延长,呈下调的变化趋势。

与对照组相比,1 h 和 8 h 组的 CFTR 基因在十二指肠、空肠、回肠中的表达上调,十二指肠的 1 h 组、空肠的 1 h 组和 8 h 组差异有显著性 ($P < 0.05$);十二指肠的 8 h 组、回肠的 1 h 组和 8 h 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。与对照组相比,结肠中 1 h 组 CFTR 基因的表达无变化,8 h 组 CFTR 基因的表

达显著下调 ($P < 0.05$)。结果提示,LPS 诱导腹泻的发生与肠道 CFTR 基因转录水平的变化密切相关,且各肠段发挥的作用不同,尤其是空肠在 Cl^- 分泌中发挥主要作用,结肠的作用最弱。

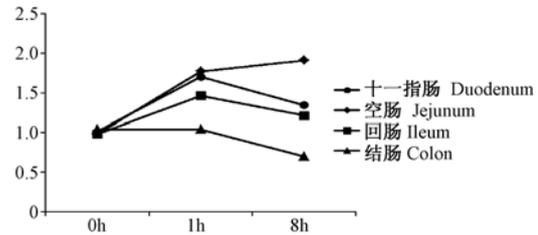


图 4 LPS 对小鼠各肠段 CFTR 基因转录水平的影响

Fig. 4 Effect of LPS on CFTR gene transcription in mouse intestinal segments

表 1 CFTR 基因在小鼠肠道中的表达

Tab. 1 Expression of CFTR gene in the mouse intestines

组别 Groups	十二指肠 Duodenum	空肠 Jejunum	回肠 Ileum	结肠 Colon
对照组 Control	1.01 ± 0.07 ^a	0.98 ± 0.05 ^a	0.98 ± 0.08	1.04 ± 0.04 ^a
1h	1.70 ± 0.09 ^b	1.77 ± 0.22 ^b	1.46 ± 0.21	1.04 ± 0.10 ^a
8h	1.34 ± 0.24 ^{a,b}	1.91 ± 0.16 ^b	1.21 ± 0.09	0.70 ± 0.08 ^b

注:同一列中不同字母为差异显著, $P < 0.05$ 。

Note. The data in the same column with different letter means significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

小肠的基础分泌和各种生理性刺激引起分泌的液体和电解质主要是为了消化食物,分泌主要发生在小肠隐窝,产生一种包含小分子的等渗溶液,便于营养物质吸收。肠管分泌与吸收过程的平衡主要依靠有绒毛的上皮细胞来维持。腹泻主要是由于肠绒毛上皮细胞对液体的吸收与肠腺分泌平衡产生紊乱,伴随大量水进入肠管所引起。尽管有很多因素能引起腹泻,但细菌分泌毒素造成肠绒毛上皮细胞结构破坏是引起腹泻的原因之一^[11]。

细菌毒素通过特异性攻击信号分子 cAMP 或细胞内 Ca^{2+} , 激活细胞 Cl^- 通道,引起 Cl^- 和水分泌增加。CFTR 是腹泻病原菌识别的最终靶位,可以促进 Cl^- 的分泌增加和 Cl^- 吸收降低,最终使肠管中 Cl^- 的浓度增加^[8]。Thiagarajah 等^[12,13] 提出细菌和肠毒素引起的分泌性腹泻,主要是由于小肠上皮细胞 cAMP 或 Ca^{2+} 信号通路激活,提高肠上皮细胞游离面 Cl^- 通道的通透性,同时 Na^+ 离子吸收下降。Marchelletta 等^[14] 发现鼠伤寒沙门氏菌感染 BALB/c 小鼠引起腹泻,结肠组织 cAMP 依赖的离子转运载体表达降低, Cl^- 和钠离子转运发生改变,而 CFTR

在结肠隐窝发生内化,改变了结肠水转运载体表达及功能。Rogers 等^[15] 发现 CFTR 是肠毒素引起腹泻的主要作用分子,证实细胞内能量敏感激酶、AMP 激活蛋白激酶能抑制 CFTR 开放,药理学研究激活 AMP 激活蛋白激酶能有效降低霍乱毒素引起的肠细胞分泌 Cl^- 。Sandle 等^[16] 研究发现内毒素诱导的分泌性腹泻可引起肠细胞上 CFTR 活性升高。本实验发现,LPS 作用 1 h 和 8 h 均可上调十二指肠、空肠、回肠中 CFTR 基因的表达;结肠 1 h 组 CFTR 基因的表达无变化,8 h 组 CFTR 基因的表达显著下调 ($P < 0.05$)。提示 LPS 通过上调十二指肠、空肠和回肠组织中 CFTR 基因的表达,提高了 Cl^- 的分泌,进而诱导小鼠腹泻。

(本文图 1,2 见彩插 8。)

参 考 文 献

- [1] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [J]. Science. 1989, 245:1066-1073.
- [2] Kunzelmann K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport [J]. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 1999, 137:1-70.

(下转第 70 页)