

网络出版时间:2012-05-22 16:32

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1632.017.html>

Borealin 基因在小鼠中的表达

张前军^{1,2}, 卢光琇^{1,2}

(1 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078; 2 人类干细胞国家工程中心, 湖南 长沙 410078)

【摘 要】 【目的】研究 *Borealin* 在小鼠早期胚胎及睾丸中的表达情况, 初步探讨 *Borealin* 的生物学功能。【方法】利用体外合成 RNA 探针, 采用全胚胎原位杂交检测 *Borealin* 基因在 9.5~10.5 日龄小鼠胚胎中的表达, 免疫组化检测 *Borealin* 基因在成年小鼠睾丸中的表达, RT-PCR 等方法检测 *Borealin* 基因在成年小鼠多组织中的表达。【结果】*Borealin* 在小鼠 9.5~10.5 日龄胚胎的头部和成年小鼠生精小管基底细胞部位有较强的表达, 在睾丸、卵巢、肠以及眼睛组织中的表达量较其他组织高。【结论】*Borealin* 在小鼠 9.5~10.5 日龄胚胎头部及成年小鼠睾丸中均有特异性表达, 可能参与了成体干细胞功能的维持。

【关键词】 *Borealin*; 全胚胎原位杂交; 精原干细胞; 纺锤体

【中图分类号】 Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)06-0007-06

Expression of *Borealin* in the mouse

ZHANG Qian-jun^{1,2}, LU Guang-xiu^{1,2}

(1 Institute of Human Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China;

2 National Center of Human Stem Cell Research and Engineering, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to investigate the function and the expression of *Borealin* for the mouse development specially, testis. 【Method】In-situ hybridization was used to detect the expression of *Borealin* in the 9.5—10.5-d mouse embryo; immunohistochemistry was taken to investigate the expression of *Borealin* in the testis of adult mouse; RT-PCR was applied to detect the expression of *Borealin* in the multi-tissues of the adult mouse. 【Result】*Borealin* is highly expressed in the brain of 9.5—10.5-d embryo and the fundus of the seminiferous tubules. The expression of *Borealin* in ovary, testis, gut and eye is higher than in other tissues. 【Conclusion】*Borealin* is expressed specifically in the brain of 9.5—10.5-d embryo and the testis of mouse, and it is involved in the function maintaining of adult stem cells.

Key words: *Borealin*; whole mount embryo insitu hybridization; spermatogonial stem cells; spindle

Borealin 基因是一个染色体过客复合物(CPC)组分, 其对肿瘤细胞的分裂与增殖及染色体的稳定具有重要的意义, RNA 干扰其表达后会出现多极纺锤体及染色体分离滞后等异常的细胞分裂事件^[1]。因此, 研究 *Borealin* 功能对了解细胞的正常分裂以及着丝粒功能均具有重要的意义。 *Borealin* 编码的

32 ku 的小分子蛋白与纺锤体、着丝粒及染色体的凝聚与分离相关, 前期参与染色质凝缩, 前中期在着丝粒上积聚, 在后期它们离开染色体转移到中心纺锤体上, 最后集中在胞质分离的赤道板上^[1]。CPC 与 Shugoshin、磷酸化的组蛋白 H3pT3、磷酸化的组蛋白 H2AS121 等一起协同作用确保两极纺锤体的

* [收稿日期] 2011-11-23

[基金项目] 教育部新教师基金项目(20090162120032); 湖南省科技计划项目(2010FJ3026)

[作者简介] 张前军(1974—), 男, 湖南华容人, 讲师, 博士, 主要从事干细胞工程学研究。E-mail: zhangqianjun@csu.edu.cn

[通信作者] 卢光琇(1937—), 女, 湖南长沙人, 教授, 博士生导师, 主要从事生殖医学、干细胞和遗传学研究。

E-mail: lugxdirector@yahoo.com.cn

稳定与形成,从而保证子代细胞遗传物质的稳定^[2-4]。*Borealin* 自己本身与肿瘤发生以及 P53 信号通路有着密切的联系^[5-6],有研究显示,*Borealin* N 端的氨基酸残基负责识别结合到纺锤体上,而 C 端的部分则很可能介导 CPC 与着丝粒的结合^[3]。同时,*Borealin* 蛋白 C 端还关系到 Survivin 在细胞增殖、细胞分裂和凋亡方面功能的体现。

然而,*Borealin* 基因在小鼠各个组织器官的表达量差异很大,目前尚不清楚 *Borealin* 基因在不同组织中的差异性表达对小鼠的正常发育与成长的作用,同时对该基因在胚胎发育过程尤其是成体干细胞中的作用也不明确。总之作为一个在胚胎干细胞中高表达的基因^[7],人们对 *Borealin* 在胚胎干细胞中及正常组织器官中的表达与功能知之甚少,且不了解其对干细胞全能性维持的作用。本研究通过原位杂交、免疫组化及 RT-PCR 等方法,系统地分析 *Borealin* 在小鼠早期胚胎及成体睾丸、卵巢、肠、脑、肾、心脏、肺、脾、眼和胃中的表达情况,以期增进人们对 *Borealin* 基因生物学功能的了解,揭示 *Borealin* 在胚胎发育、干细胞有丝分裂和全能性维持、细胞凋亡及其他人们未知领域中所起的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

ICR 小鼠,由中南大学动物学部提供,用 1 万级层流动物房光控饲养(明 14 h,暗 10 h);P19 细胞,美国 ATCC 产品;T7 和 SP6 RNA 合成酶、内切酶、RT 及 PCR 试剂,美国 MBI 公司产品;高速冷冻离心机、PCR 仪,Eppendorf 公司产品;恒温循环水浴、VDS 紫外凝胶摄影仪,Pharmacia 公司产品;二氧化碳培养箱,美国 Thermo 公司产品;−70 °C 冰箱,美国 Forma Scientific 公司产品;紫外分光光度仪、高速冷冻离心机,Becman 公司产品;DYY-III 型电泳仪、水平和垂直电泳槽,北京六一仪器厂产品;杂交炉,英国 Hybrid 公司产品;制冰机,意大利 SCOTSMAN 公司产品;水浴箱,美国 Polystat 公司产品;光学显微镜和倒置显微镜,Olympus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 体外转录短片 RNA 探针 提取 P19 细胞的总 RNA,逆转录试剂盒合成单链 cDNA 备用。用 Primer 3 软件针对 *Borealin* 基因编码区设计杂交探针引物 F、R,并由大连宝生物公司合成,其中 F 的序列为:5'-TGCCTTCCATCCAAGAAGAG-3',R 的序列为:5'-AGGTGTTGGCAGTGAAGGAC-

3',以合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *Borealin* 1 个 450 bp 的特异片段,PCR 反应体系为 10 μL: 10×Reaction Buffer 1 μL,模板 cDNA 0.5 μL,上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,下游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,dNTP 0.5 μL,*Taq* 酶 0.2 μL,补 ddH₂O 至 10 μL。PCR 反应程序为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 循环;72 °C 5 min。对扩增产物用 20 g/L 琼脂糖电泳检测后,分别克隆到带有 T7、SP6 启动子的 T 载体上(Pro-mega 公司),由大连宝生物公司完成进行测序鉴定。提取重组质粒 DNA,用 *EcoR* I、*Bam* H I 酶切质粒纯化回收插入片段后,作为 RNA 合成模板。取 1.5 mL EP 管,室温下依次加入 RNase-free dH₂O 10×Transcription Buffer、ATP、GTP、CTP、地高辛标记的 UTP 及 T7、SP6 RNA 合成酶,42 °C 孵育 1 h;混合物中加入 DNase I (2 U/L),37 °C 反应 15 min,酶切去除模板 DNA;然后加入醋酸铵终止液和 2 倍体积的无水乙醇,13 000 r/min 离心纯化探针;弃上清液,将探针重悬于 RNase-free dH₂O 中,−20 °C 保存。合成的 RNA 探针经 20 g/L 琼脂糖电泳检测后于 −80 °C 保存备用。

1.2.2 全胚胎原位杂交^[8] 超排 ICR 小鼠,选取 9.5~10.5 日龄的小鼠胚胎,依次用体积分数 95%,75%,50%和 25%的甲醇进行处理;PBS 清洗,20 g/L 焦碳酸二乙酯和蛋白酶 K 37 °C 孵育,PBS 清洗 5 min,0.2 mol/L 的 HCl 孵育 30 min;PBS 清洗后,体积分数 0.25%无水乙酸和 0.1 mol/L 三乙醇胺孵育 10 min;预杂交缓冲液孵育 1 h。使用预杂交缓冲液稀释探针,85 °C 加热 5 min,置于冰块中 10 min;杂交过夜。将试验小鼠胚胎在加有探针的杂交缓冲液中 65 °C 孵育过夜,对照组小鼠胚胎在加有与探针互补序列的杂交缓冲液中 65 °C 孵育过夜,加入 PBS 清洗;加入 RNA 酶 A (0.1~1 ng/mL PBS),37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗 5 min,依次用 2×SSC、1×SSC、0.5×SSC 37 °C 清洗 10 min,MAB 缓冲液 65 °C 孵育 10 min;胚胎与含体积百分数 10%正常绵羊血清抗体缓冲液一起孵育 1 h;加入抗地高辛抗体(1:10 000 稀释),37 °C 孵育 3 h,PBS 清洗 4 次,每次 10 min;AP1 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min;加入 NBT/BCIP 暗处保存 30~60 min,显微镜下进行观察,固定拍照。

1.2.3 *Borealin* 基因在小鼠睾丸中表达的免疫组化检测 采用原核表达的 *Borealin* 蛋白免疫新西兰兔,分离血清获得兔抗鼠的 *Borealin* 抗体;同时分离

未经免疫的新西兰兔血清作为对照。取成年小鼠睾丸,用 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,经脱蜡处理后,用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 15 min,加入 500 g/L 封闭处理,然后依次加入一抗(兔抗鼠的 *Borealin* 抗体,以 1 : 200 比例稀释)和二抗(羊抗鼠二抗,1 : 500 比例稀释,KPL 公司产品)孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次后 DAB 显色,蒸馏水洗;苏木素复染 2 min,盐酸酒精分化;脱水、透明、封片、镜检。同时设立对照组,以未经免疫的兔 IgG 为一抗。

1.2.4 RT-PCR 检测 分别取小鼠睾丸、卵巢、肠、脑、肾、心脏、肺、脾、眼、胃组织 2 g 左右,在液氮中于研钵里研碎后加入 TRIzol 1 mL,置冰上 5 min,加入氯仿 0.2 mL,剧烈振摇 15 s,置冰上 2 min,4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,吸取上层水相至另一离心管中,加异丙醇 0.5 mL,置 -20 ℃ 20 min,4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,体积分数 75% 乙醇洗涤后用适量 DEPC 水溶解,-20 ℃ 保存备用。取 RNA 2 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL,10 Reaction Buffer 2 μL,dNTPs (10 mmol/L) 2 μL,RNasin(40 U/μL)0.5 μL,AMV 逆转录酶 1 μL,Oligo(dT) 1 μL,补 ddH₂O 至 20 μL,42 ℃ 孵育 1 h,以此为模板进行 PCR 检测。采用 Primer 3 软件设计 *GAPDH* 和 *Borealin* 引物,并由大连宝生物公司合成,其中 *GAPDH* 序列为: F,5'-TGATGATATCGCCGCGCTCGTCGT-3';R,5'-CACAGCCTGGATAGCAACG

TACAT-3'。*Borealin* 序列为:F,5'-ATGGCTCCC AAGAAACGCAGCAGCC-3';R, 5'-TCATCGGC-CCGTCCGTATGCTG-3'。以 *GAPDH* 为内参基因,进行 PCR 反应。PCR 反应体系 10 μL:10 Reaction Buffer 1 μL,模板 cDNA 0.5 μL,上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,下游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,dNTP 0.5 μL,*Taq* 酶 0.2 μL,补 ddH₂O 至 10 μL;PCR 反应程序为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55~62 ℃ 30 s,72 ℃ 40~55 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 RNA 探针的鉴定

以 P19 细胞的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得了 *Borealin* 基因 1 个 450 bp 的特异片段(图 1)。将其克隆到带有 T7、SP6 启动子的 T 载体上,测序鉴定结果表明,片段插入方向正确,插入的片段为 *Borealin* 特异性序列。分别用 T7 和 SP6 RNA 合成酶,体外合成了地高辛标记的 cRNA 探针。T7 RNA 合成酶合成产物为 cRNA 杂交探针,SP6 RNA 合成酶合成产物为 RNA 探针,用作对照。电泳结果(图 2)表明,合成的探针是 1 条约 450 bp 的特异 RNA 探针。

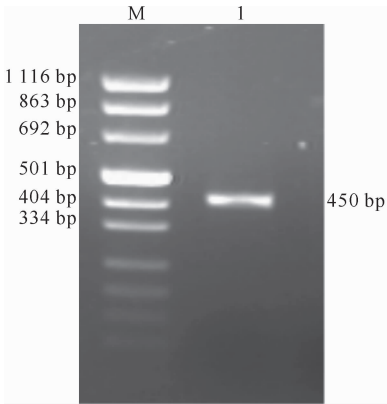


图 1 *Borealin* 基因 450 bp 特异性片段的 PCR 扩增

M. DNA Marker;1. PCR 产物

Fig.1 Amplification of the 450 bp specific fragment of *Borealin*

M. DNA Marker;1. PCR products

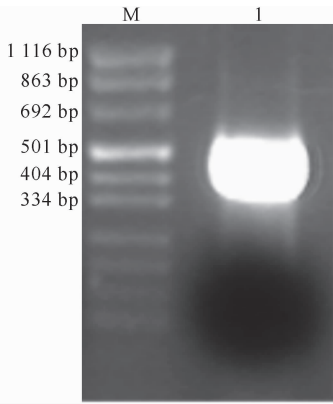


图 2 合成的 RNA 探针的电泳检测

M. DNA Marker;1. 合成的 RNA 探针

Fig.2 Electrophoresis detection of syntheses of the RNA probe

M. DNA Marker;1. RNA probe

2.2 *Borealin* 基因在小鼠早期胚胎中的表达

取 9.5~10.5 日龄的 ICR 小鼠胚胎进行全胚胎原位杂交试验,结果表明,对照组无明显信号(图

3A)。试验组 *Borealin* 基因在小鼠胚胎的四肢、头部、尾部及背部等大部分位置都有表达,而在小鼠腹部及内脏区域无明显表达,其中胚胎头部区域的表

达量明显高于其他部位,在该区域检测到非常明显的信号(图 3B)。由于 *Hox* 家族基因^[9-10] 及 *Notch*^[11-12] 等干细胞相关基因在小鼠早期胚胎头部

都有非常明显的表达,所以小鼠早期胚胎头部检测到的信号提示,*Borealin* 可能在干细胞中还有未被发现的生物学功能。

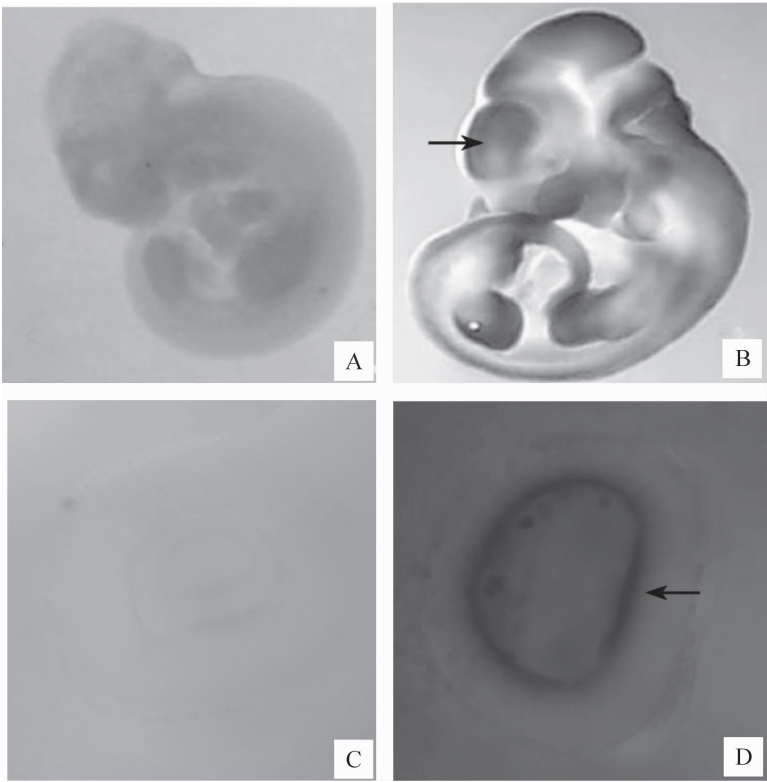


图 3 *Borealin* 基因在 9.5~10.5 日龄小鼠胚胎及睾丸中的表达

A、C. 对照组;B、D. 试验组;A、B. *Borealin* 在小鼠胚胎中的表达;
C、D. *Borealin* 在小鼠胚胎眼睛部位的表达;箭头示信号区域

Fig. 3 Expression of *Borealin* in 9.5—10.5 dpc mouse embryo and testis

A、C. Control;B、D. Assay;A、B. Expression of *Borealin* in 9.5—10.5 dpc mouse embryo;
C、D. Expression of *Borealin* in the eyes of mouse embryo;The arrow indicates signal region

9.5~10.5 日龄小鼠胚胎头部放大观察结果表明,在与 RNA 相同序列的地高辛标记探针杂交的对照组中,小鼠眼部无明显信号显示(图 3C);而试验组小鼠眼部有一个非常强的信号区域(图 3D),该信号区域分布具有明显的规律性,即主要集中在角膜边缘部位,此处可能是角膜干细胞的主要区域,提示 *Borealin* 的表达可能参与了小鼠角膜干细胞的功能维持,从而确保角膜的不断自我修复。

2.3 *Borealin* 在成年小鼠睾丸中的表达

通过免疫组化检测 *Borealin* 在精原干细胞及生精过程中的表达,结果(图 4)表明,未在对对照组小鼠睾丸组织检测到明显的信号显示(图 4A),而在试验组小鼠睾丸中可检测到明显的信号(图 4B),说明制备的第 1 抗体具有特异性,可以用于 *Borealin* 表达的检测。免疫组化检测结果显示,在初级精母细胞、次级精母细胞及精子细胞均检测到染色信号,表

明 *Borealin* 在睾丸的这些部位有不同程度的表达。与试验组小鼠睾丸组织中不同部位检测到的信号进行比较,结果发现,生精小管基底膜处细胞的 *Borealin* 表达水平明显高于其他部位,而此处正是精原干细胞集中的位置,所以对睾丸而言,*Borealin* 可能主要参与精原干细胞功能的维持。

2.4 *Borealin* 在小鼠多组织中表达的差异性

RT-PCR 分析结果(图 5)表明,供试小鼠睾丸、卵巢、肠、脑、肾、心脏、肺、脾、眼、胃组织在 900~1 000 bp 处均有 1 条特异的扩增条带,*GAPDH* 在各组织中均有表达,*Borealin* 基因在睾丸、卵巢、肠以及眼睛组织中的表达量较其他组织高,尤其是睾丸和卵巢中的 *Borealin* 表达量更高。此外,在眼睛和肠中,*Borealin* 的表达也高于其他组织器官,这与原位杂交和免疫组化的检测结果基本一致。

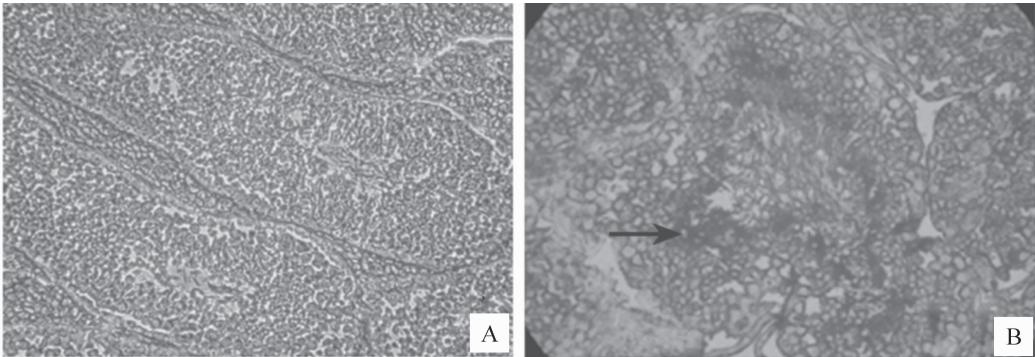


图 4 *Borealin* 在小鼠睾丸中的表达
A. 对照组;B. 试验组;箭头示信号区域

Fig. 4 Expression of *Borealin* in the testis

A. Control;B. Assay;Arrow point to the signal region

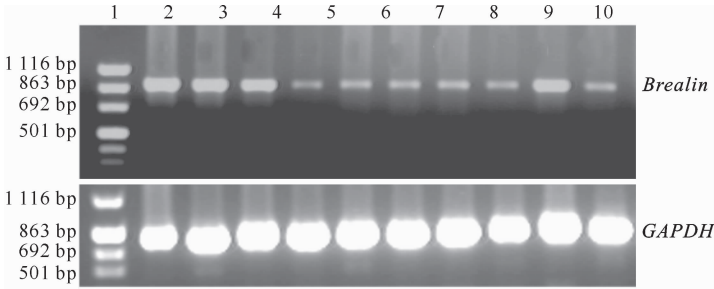


图 5 *Borealin* 在小鼠多组织中的表达

1. 睾丸;2. 卵巢;3. 肠;4. 脑;5. 肾;6. 心脏;7. 肺;8. 脾;9. 眼;10. 胃

Fig. 5 Expression of *Borealin* in Mouse Multi-tissues

1. Testis;2. ovary;3. Gut;4. Brain;5. Kidney;6. Heart;7. Lung;8. Spleen;9. Eye;10. Stomach

3 讨 论

小鼠全胚胎原位杂交试验结果证明,在小鼠发育的 9.5~10.5 日龄,*Borealin* 在内脏区域没有表达,此时的小鼠内脏器官正处于发育的一个重要阶段,但并不需要 *Borealin* 的表达,说明 *Borealin* 的生物学功能决不仅仅是作为染色体过客复合物这么简单。因为在这个时期,小鼠内脏器官的细胞也在分裂,也需要形成纺锤体以及染色体过客复合物,但是其组织细胞里却无 *Borealin* 的表达,表明这个时期的小鼠胚胎细胞中可能并不需要 *Borealin* 在这个方面的功能来维持其生长发育。在小鼠胚胎的脑部区域,*Borealin* 却存在非常强的信号,说明其在这个区域的表达比较多。考虑到很多与胚胎干细胞功能相关的基因,如 *Hox* 家族基因和 *Notch* 基因等,在小鼠早期胚胎的脑部都有比较强的表达,所以 *Borealin* 在这个区域的表达可能从另外一个方面提示人们:*Borealin* 生物学功能可能确实与神经发育或胚胎干细胞有重要联系。

生精小管中的基底细胞是精原干细胞的主要集中地,其通过多次有丝分裂来克隆性扩增,从精原细胞到最后产生精子是一个连续分化与成熟的动态过程。*Borealin* 在精原干细胞中的高表达可能对该成体干细胞的维持及增殖具有重要意义。基底细胞通过生精上皮内的支持细胞和生精细胞紧密连接,支持细胞跨越整个生精上皮并延伸至生精小管的近腔室,以此来提供结构、激素和营养支持生精细胞,通过减数分裂有序地形成精原细胞和精子,维持种族后代的延续^[13]。精原干细胞是成体干细胞中的一种,是一群位于生精上皮基底部的细胞,具有高度自我更新能力和多向分化潜能,它能向子代传递遗传信息,是男性成体内惟一可复制的双倍体永生细胞^[14]。精原干细胞存在两种可能的分化机制:一种是通过有丝分裂方式产生新的干细胞;另外一种形成初级精母细胞,初级精母细胞经过一系列分化阶段(不同哺乳动物的分化阶段有差异)最终形成成熟的精子。因此,由于精原干细胞的存在,使精子的发生过程可以持续存在于整个雄性个体的一生,其

通过有序而又严格调控的细胞增殖和分化步骤产生大量的精子^[15],*Borealin* 在精原干细胞中的表达有可能对精原干细胞的生存、维持以及精子的形成与发生具有重要的生物学意义。另外,*Borealin* 在角膜处的表达情况,提示其功能可能与角膜干细胞的功能相关,说明 *Borealin* 可能确实参与了成体干细胞功能的维持。但是 *Borealin* 的表达情况只是其生物学功能体现的一个方面,其具体详细的作用机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Gassmann R,Carvalho A,Henzing A J,et al. Borealin:A novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle [J]. J Cell Biology,2004,166(2):179-191.

[2] Yamagishi Y,Honda T,Tanno Y,et al. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation [J]. Science,2010,330(6001):239-243.

[3] Kelly A E,Ghenoiu C,Xue J Z,et al. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine-3 to activate the mitotic kinase Aurora B [J]. Science,2010,330(6001):235-239.

[4] Wang F,Dai J,Daum J R,et al. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis [J]. Science,2010,330(6001):231-235.

[5] Chang J L,Chen T H,Wang C F,et al. Borealin/Dasra B is a cell cycle-regulated chromosomal passenger protein and its nuclear accumulation is linked to poor prognosis for human gastric cancer [J]. Exp Cell Res,2006,312:962-973.

[6] Date D A,Jacob C J,Bekier M E,et al. Borealin is repressed in response to p53/Rb signaling [J]. Cell Biology International,

2007,31:1470-1481.

[7] Zhang Q J,Lin G,Gu Y F,et al. *Borealin* is differentially expressed in ES cells and is essential for the early development of embryonic cells [J]. Mol Biol Rep,2009,36(3):603-609.

[8] Futahashi R. Whole-mount in situ hybridization of sectioned tissues of species hybrids to detect cis-regulatory changes in gene expression pattern [J]. Methods Mol Biol,2011,772:319-328.

[9] Gouti M,Briscoe J,Gavalas A. Anterior *Hox* genes interact with components of the neural crest specification network to induce neural crest fates [J]. Stem Cells,2011,29(5):858-870.

[10] Bardine N,Donow C,Korte B,et al. Two *Hoxc6* transcripts are differentially expressed and regulate primary neurogenesis in *Xenopus laevis* [J]. Dev Dyn,2009,238(3):755-765.

[11] Takano A,Zochi R,Hibi M,et al. Function of strawberry *Notch* family genes in the zebrafish brain development [J]. Kobe J Med Sci,2011,56(5):220-230.

[12] Imayoshi I,Kageyama R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis [J]. Mol Neurobiol,2011,44(1):7-12.

[13] Bördlein A,Scherthan H,Nelkenbrecher C,et al. SPOC1 (PH F13) is required for spermatogonial stem cell differentiation and sustained spermatogenesis [J]. J Cell Sci,2011,124(15):3137-3148.

[14] Ebata K T,Yeh J R,Zhang X,et al. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors *in vitro* [J]. Exp Cell Res,2011,317(10):1319-1329.

[15] Eguizabal C,Montserrat N,Vassena R,et al. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cells,2011,29(8):1186-1195.