

肝窦内皮细胞和枯否细胞中 bcl-2 和 GAPDH mRNA 半衰期的测定

陈宏¹, Dargel R², Schreckenber C², Vogl S²

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 Institute of Pathobiochemistry,
Medical Faculty, Friedrich-Schiller-University, D-07740 Jena, Germany)

[摘要] 通过反转录 PCR (RT-PCR) 测定了肝窦内皮细胞和枯否细胞中 bcl-2 和 GAPDH mRNA 的半衰期。结果表明, 在窦内皮细胞中 bcl-2 和 GAPDH mRNA 的半衰期分别为 6.13 和大于 20 h, 在枯否细胞中 bcl-2 和 GAPDH mRNA 的半衰期分别为 5.86 和 13.74 h。

[关键词] RT-PCR; 窦内皮细胞; 枯否细胞; mRNA 半衰期

[中图分类号] Q344+.13

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0015-04

DNA 通过转录把所携带的遗传信息传递给 mRNA, mRNA 再经翻译过程表达出蛋白质。已知 mRNA 的含量和稳定性直接影响着基因表达的最终结果。所以, 了解各种 mRNA 的稳定性对于基因表达调控的研究十分重要。

1 材料和方法

1.1 材料

化学试剂 所用化学试剂都是化学纯度并来自于商业途径。DNase I 购于 Boehringer (Mannheim, 德国), Reverse Transcription System 和 RNasin 来自于 Promega (Mannheim, 德国), RPM I 1640 培养基和胶原酶来自 Bichrom (Berlin, 德国), Actinomycin D 购于 Fluka (德国)。

RT-PCR 反应引物 从 Genbank 获得大白鼠 bcl-2 和 GAPDH 基因的 DNA 序列并设计了合成这 2 个基因的引物。bcl-2 的正向引物为 CGTCA TAACTAAA GACACCCC (85~105), 反向引物为 TTCA TCTCCA GTA TCCCACTC (339~319); GAPDH 的正向引物为 ACCACA GTCCA TGCCA TCAC (591~610), 反向引物为 TCCACCA CCCTGTTGCTGTA (1042~1023)。

实验动物 Wistar 大白鼠。

1.2 方法

窦内皮细胞和枯否细胞的分离 窦内皮细胞和

枯否细胞从大白鼠纤维化的肝脏中按照 Vogl 等^[1]和陈宏等^[2]的方法分离。

细胞培养^[3]和 Actinomycin D 处理 将细胞在 RPM I 1640 培养基中制成悬浮液, 然后在 37℃, 体积分数 5% CO₂ 中培养 20 h 贴壁后, 用质量浓度为 2~3 μg/mL 的 Actinomycin D 的新培养基更换旧培养基并继续培养。Actinomycin D 能够阻断转录过程, 在加入 Actinomycin D 后不同时间点即: 0, 2, 5, 5.0, 7.5 和 10 h 分别收获细胞并用 PBS 液洗 2 次。

总 RNA 的分离 采取快速法从细胞中分离总的 RNA, 即细胞洗涤离心后将 200 μL 溶液 A (10 mmol/L Tris/HCl pH 7.5; 0.15 mol/L NaCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; 体积分数 65% NP-40) 加到细胞沉淀物中, 15 s 旋转振荡。通过 800 × g, 4℃, 4 min 离心除去细胞核, 上清液转入另一干净试管。然后加入 30 μmol/min 无 RNA 酶的 DNase I, 37℃ 温浴 30 min。之后样品转到已放有 200 μL 溶液 B (7 mol/L Guanidinium thiocyanate; 质量体积 1% SDS; 0.35 mol/L NaCl; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L Tris/HCl pH 7.5) 的试管中, 混合后用酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 提取, 然后用 2.5 倍体积分数 100% 乙醇沉淀。15 000 r/min (Eppendorf) 离心, 体积分数 70% 乙醇洗, 气干后溶解在 10 μL DEPC-H₂O 中。用 260 nm 波长分光光度计确定浓度后, -80℃ 保存备

[收稿日期] 2000-04-03

[基金项目] 德国 DFG 基金资助项目

[作者简介] 陈宏 (1955-), 男, 陕西西安市人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传学与动物分子生物学研究。

用。

mRNA 的反转录 终体积为 20 μL 的反转录反应混合物(含 1 μg 总 RNA, 0.5 μg Oligo(dT)₁₅, 20 $\mu\text{mol}/\text{min}$ RNasin Ribonuclease Inhibitor, 5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris/HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 体积分数 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L dNTP)在 PCR 仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 进行 1 h, 以获第 1 条 cDNA 链。

PCR 反应 在终体积为 25 μL 的 PCR 反应物中, 含 5 μL 第 1 条 cDNA 链反转录产物, 1 μL 25 mmol/L MgCl₂, 2 μL 10 (反转录缓冲液, 12.5 pmol 正向引物, 12.5 pmol 反向引物, 4.17 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Taq DNA Polymerase, 加超纯水到 25 μL 。PCR 反应在 PTC-200 Cycler (Biozym, 德国) PCR 仪中进行, 反应的程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 链延长 2 min 30 个循环, 最后一步延长 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

反应产物的电泳与分析 PCR 扩增后, 反应产物在质量浓度 15 g/L 的琼脂糖凝胶, TBE 缓冲液中, 60 V 电泳 1.5~2.0 h。电泳后琼脂糖凝胶在

Sybr Green I (用 TBE 缓冲液 1:10 000 稀释)中染色 30 min。然后在凝胶成像仪(HeroLab, Wiesloch, 德国)上观察、照相。带的量化分析通过计算机 Image-Prgramm 进行。每一实验来自 5~8 个独立的细胞制剂。

2 结果与分析

电泳后基因 bcl-2 出现 1 条 250 bp 的特异性扩增带, 对于基因 GAPDH 出现 1 条 451 bp 的特异性扩增带(图 1)。由于 Actinomycin D 是一个转录阻断剂, 在加入 Actinomycin D 后, RNA 的转录停止。从图上可以看出, 随着 Actinomycin D 处理时间的延长, mRNA 的量逐渐减少。这说明 RNA 在不断地降解。这些带经计算机 Image-Prgramm 程序量化分析后, 根据获得数据得出 mRNA 的降解曲线图(图 2~5), 并计算了 bcl-2 和 GAPDH mRNA 在窦内皮细胞和枯否细胞中的半衰期($t_{1/2}$), 其结果为 bcl-2 mRNA 在窦内皮细胞和枯否细胞中分别为 6.13 和 5.86 h。GAPDH mRNA 在窦内皮细胞和枯否细胞中分别为大于 20 和 13.47 h。

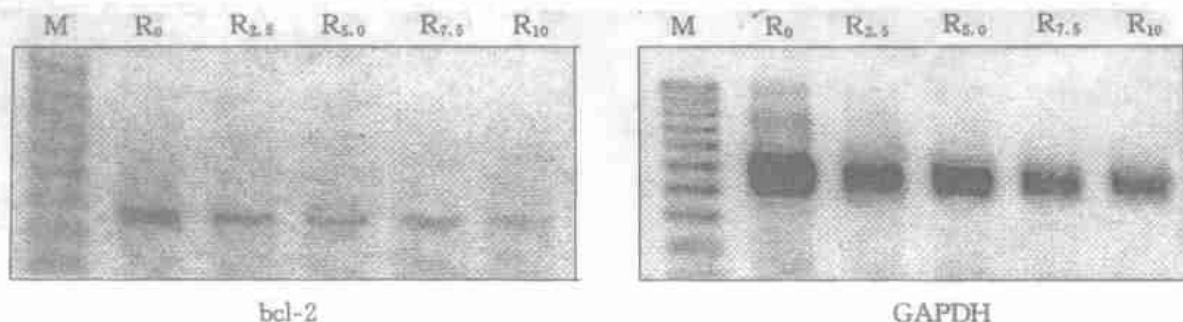


图 1 在枯否细胞中, bcl-2 和 GAPDH 基因 RT-PCR 扩增产物电泳凝胶图

M. 100 bp DNA Ladder 分子大小 Marker; R₀~R₁₀ 用 Actinomycin D 处理时间; R₀ 0 h; R_{2.5} 2.5 h; R_{5.0} 5 h; R_{7.5} 7.5 h; R₁₀ 10 h

Fig 1 Electrophoresis gel patterns of amplified products of bcl-2 and GAPDH-genes by RT-PCR

M. Molecular size marker 100 bp DNA Ladder; R₀~R₁₀ Treatment time with actinomycin D; R₀ 0 h; R_{2.5} 2.5 h; R_{5.0} 5 h; R_{7.5} 7.5 h; R₁₀ 10 h

研究结果表明, 同一基因的 mRNA 在不同细胞中的降解速率不同, 不同基因的 mRNA 在同一细胞中的降解速率也不同。这两个基因的 mRNA 在枯否细胞比在窦内皮细胞中的降解速度快。在加入 Actinomycin D 后细胞培养的过程中, 我们也观察到在 7.5 h 时间点之后所收获的枯否细胞比窦内皮细胞明显少, 这说明枯否细胞比窦内皮细胞对 Actinomycin D 更敏感, 在 Actinomycin D 处理之下更易死亡。

3 讨论

利用 RT-PCR 测定 mRNA 的半衰期是一种新的方法, 它比杂交分析法简便、快速、所需样品量少、准确性高, 是一个值得借鉴的方法。它的基本原理是细胞中 mRNA 的分子数多, 经反转录所得到的第 1 条 cDNA 链的分子也多, 反应产物的量与 PCR 反应溶液中 cDNA 分子的浓度成正比。然而由于 PCR 扩增曲线的特性, 即 PCR 扩增产物增加到一定量时, 扩增产物将不再按级数增加。所以, 在利用 RT-PCR

测定 mRNA 的降解速率时, 根据引物和扩增片断的长度, 需要摸索一个最佳的反应循环数目。为此, 本试验用了 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 个反应循环作筛选试验, 在 10, 15 和 20 个循环的不同试验中, 产物太少, 不易分析。在 35, 40, 45 个循环中, 由于产物太多, 致使在 Actinomycin D 处理后的不同时间的样品几乎显出相同强度的带纹, 故也不能采纳。反应循环在 25~30 周期之间比较理想, 即能得出足够的扩增产物, 又能显出不同时间组的差异。

相同 mRNA 在不同细胞中的降解速率及不同 mRNA 在相同细胞中降解速率的差异与机体基因

调控机制有关。在基因表达调控中, 调控可以发生在 DNA 水平上, 也可发生在转录和翻译水平上^[4]。RNA 的稳定性是基因在翻译水平上调节的重要方式之一。在哺乳动物中, 不同的 mRNA 的稳定性差异很大, 半衰期为 0.5~>20 h, 甚至几天。一般持家基因 mRNA 的寿命长, 而与细胞分裂和坏死有关基因 mRNA 的寿命短。GA PDH 是细胞生命代谢必须的酶, 因而其寿命比 bcl-2 的长。mRNA 的寿命延长, 增加了细胞内部 mRNA 的浓度, 从而提高了蛋白质合成的起始速度。

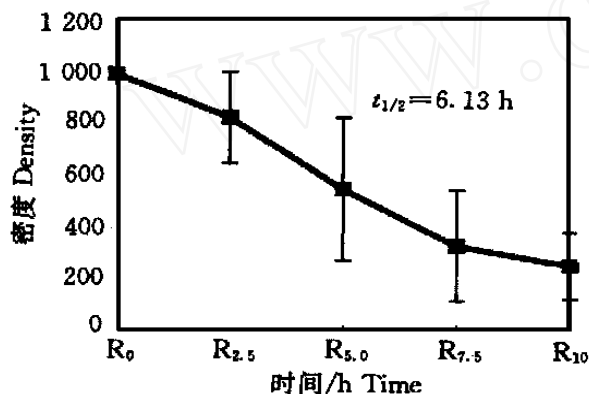


图 2 在窦内皮细胞中 bcl-2 mRNA 降解的
曲线图 $t_{1/2} = 6.13$ h

Fig 2 Diagram of bcl-2 mRNA degradation in sinusoidal endothelial cells $t_{1/2} = 6.13$ h

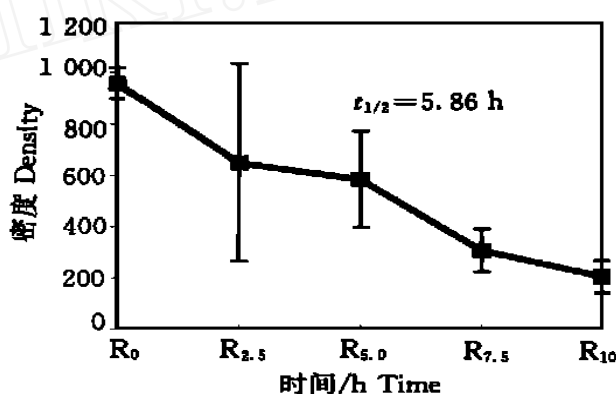


图 3 在枯否细胞中 bcl-2 mRNA 降解的
曲线图 $t_{1/2} = 5.86$ h

Fig 3 Diagram of bcl-2 mRNA degradation in Kupffer cells $t_{1/2} = 5.86$ h

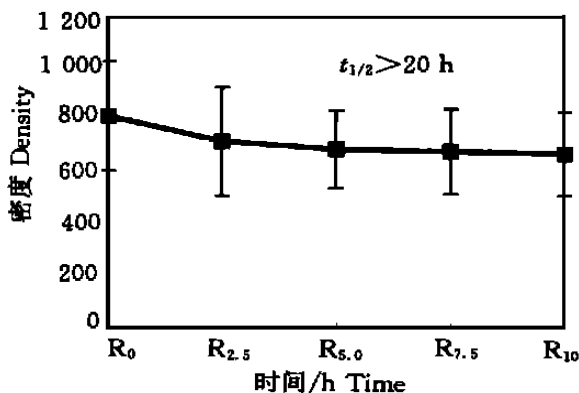


图 4 在窦内皮细胞中 GA PDH mRNA 降解的
曲线图 $t_{1/2} > 20$ h

Fig 4 Diagram of GA PDH mRNA degradation in sinusoidal endothelial cells $t_{1/2} > 20$ h

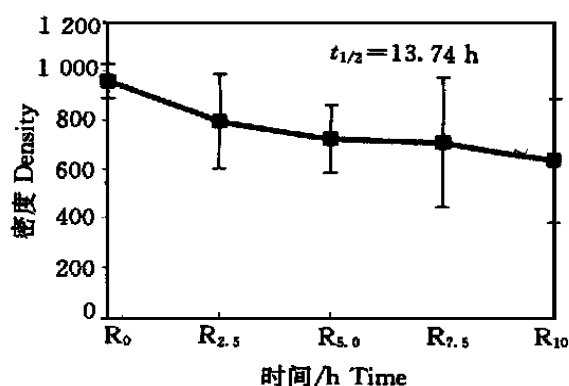


图 5 在枯否细胞中 GA PDH mRNA 降解的
曲线图 $t_{1/2} = 13.74$ h

Fig 5 Diagram of GA PDH mRNA degradation in Kupffer cells $t_{1/2} = 13.74$ h

[参考文献]

- [1] Vogl S, Petemann H, Dargel R. Oxygen radical formation, proliferative activity and phagocytic capacity of cultivated macrophages from

- cirrhotic rat livers[J]. *Liver*, 1996, 16: 313- 320.
- [2] Petemann H, Heymann S, Vogl S, *et al* Phagocytic function and metabolite production in thioacetamide-induced liver cirrhosis: a comparative study in perfused livers and cultured Kupffer cells[J]. *Journal of Hepatology*, 1996, 24: 486- 477.
- [3] 陈 宏, Stolz FM, Dargel R. 纤维化肝窦内皮细胞中基因表达的研究[J]. *西北农业大学学报*, 2000, 28(4): 69- 74.
- [4] 孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦. 分子遗传学[M]. 南京: 南京大学出版社, 1990.
- [5] Kren B T, Trembley J H, Steer C J. Alterations in mRNA stability during rat liver regeneration[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: (Gastrointest Liver Physiol, 33): G763- G777.
- [6] Kren B T, Teela L, Steer C J. Transcriptional rate and steady-state changes of retinoblastoma mRNA in regenerating rat liver[J]. *Hepatology*, 1994, 19: 1214- 1222.
- [7] Albrecht J H, Müller-Eberhard U, Kren B T, *et al* Influence of transcriptional regulation and mRNA stability on hemopexin gene expression in regenerating liver[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 314(1): 229- 233.

Half life determination of bcl-2 and GAPDH mRNA in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells of rat liver

CHEN Hong¹, R Dargel², C Schreckenber², S Vogl²

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 Institute of Pathobiochemistry, Medical Faculty, Friedrich-Schiller-University, D-07740 Jena, Germany)

Abstract: In the study, half lives of bcl-2 and GAPDH mRNA were determined in isolated sinusoidal endothelial cells (SEC) and Kupffer cells (KC) of rat livers during Thioacetamide-induced Fibrosis by RT-PCR. The results showed that half lives of bcl-2 and GAPDH mRNA were 6.13 hours and over 20 hours respectively in sinusoidal endothelial cells, and 5.86 hours and 13.74 hours respectively in Kupffer cells.

Key words: RT-PCR; sinusoidal endothelial cells; Kupffer cells; mRNA half life; determination

(上接第 14 页)

A morphological study of the genesis and development of goat embryo heart

HOU Ling-ling, ZHANG Yong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper observes the genesis and development of embryo heart in goat by light microscope. The results indicate: The embryo at the age of 15 days and 20 hours is undergoing differentiation phase of embryonic layer. The microvascular primordium appears in the mesoderm at this stage; The paired endocardial heart tubes come to lie bilateral to the foregut at the stage of 16- 18 days and fused to a single tube in ventral to the foregut at the stage of 18- 20 days. At this time, external morphogenic movement and internal partitioning process achieve at the age of 20- 34 days. From 34 to 105 days, embryo heart develops further and goes into mature stage. This experiment finds that the fibroplastic triangle of the cardiac skeleton is composed of dense connective tissue at the beginning of genesis and then changes into hyaline cartilage with the development of embryo, which shows the species specificity.

Key words: goat embryo; genesis and development; heart