

大鼠促红细胞生成素受体基因克隆及其在颅脑损伤模型中的表达分析

李伟, 齐麟

(铁道警察学院, 郑州 450053)

摘要:利用巢式 PCR(nest PCR)的方法克隆大鼠促红细胞生成素受体基因. 该基因 ORF 区全长 1 524 bp, 编码 507 个氨基酸, 推测其相对分子质量为 55.48 ku, 等电点 5.07. 实时荧光定量 PCR 结果显示:大鼠早期颅脑损伤中, EPOR 基因表达呈逐步上升趋势, 颅脑损伤后 24 h 表达量达到顶峰, 为对照组的 6 倍.

关键词:大鼠; 颅脑损伤; 促红细胞生成素受体; 实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q786

文献标志码:A

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)及其受体(erythropoietin receptor, EPOR)在神经损伤修复中具有重要意义^[1]. EPO 与 EPOR 结合后, 通过 JAK2(Janus Kinase 2)^[2]、NF- κ B^[3] 信号通路发挥抑制细胞凋亡^[4]、抗细胞兴奋性毒性^[5]、抗氧化应激^[6]、减轻脑水肿、降低缺血部位的炎症反应和诱导神经元修复^[7]等生物学功能. 本研究在克隆大鼠 EPOR 全长开放读码框并进行生物信息学分析的基础上, 采用自由落体建立大鼠颅脑损伤模型, 检测大鼠颅脑损伤后脑组织 EPOR mRNA 表达的变化情况, 为法医学损伤时间推断提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级 SD 大鼠(250 \pm 20) g 30 只, 雌雄不拘, 购自郑州大学医学实验动物中心. RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent、逆转录试剂盒、Real-time PCR mix 试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒分别购自 Invitrogen 公司、TaKaRa 公司、TOYOBO 公司和 Omega 公司. Taq 酶(LA-Taq, 5 u/ μ L)和 DNA Marker 购于 TaKaRa 公司. dNTP(10 mM each)购于鼎国生物技术有限公司. 实验中所用引物的合成以及 DNA 序列的测定均由英骏生物技术公司提供.

1.2 大鼠 EPOR 基因 ORF 的全长克隆

依据试剂盒说明书进行大鼠 RNA 提取及 cDNA 一链合成. cDNA 一链合成后用灭菌双馏水进行 5 倍稀释, 稀释产物作为扩增模板. 根据 NCBI 数据库 EPOR 信息(基因编号:NM_017002), 在基因非编码区设计引物扩增 EPOR 全长开放读码框(ORF). 第一轮 PCR 上游引物序列:5'GGAGAAAGAGGAAAGG-GAAGG3', 下游引物序列:5'TGCAAGGCTGTCACTTCCTG3'. 第一轮 PCR 程序中退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 延伸时间为 120 s, 经过 20 个循环后取 PCR 产物稀释 5 倍做模板进行巢式 PCR. 巢式 PCR 上游引物:5'AAGGGAAGGGGAGGTGGG3', 巢式 PCR 下游引物:5'GGCTCAGCCATCCTCTTC3'. 巢式 PCR 程序中退火温度为 56 $^{\circ}$ C, 延伸时间为 90 s, 进行 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min 后进行 T-A 克隆, 阳性克隆产物

收稿日期:2014-11-20

基金项目:公安部科技创新项目(2012YYCXTDGZ137;2012YYCXTDGZ139)

作者简介:李伟(1973-),男,河南孟津人,铁道警察学院副教授,主要从事法医病理学研究, E-mail:liwei@rpc.edu.cn.

通信作者:齐麟(1981-),男,铁道警官学院副教授,主要从事分子生物学研究, E-mail:qilin@rpc.edu.cn.

经 DNA 测序验证后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 大鼠 EPOR 蛋白生物信息学分析

应用 MEGA 生物学软件构建各物种 EPOR 蛋白系统进化树;应用“Translate tool”工具对大鼠 EPOR 蛋白序列进行推导;应用“Computer pI/Mw”工具预测大鼠 EPOR 蛋白相对分子质量与等电点。使用网络“SMART”工具及“TMHMM”工具分别分析蛋白结构域和蛋白的跨膜区。

1.4 大鼠颅脑损伤模型建立

根据 Feeney 的法^[8]建立大鼠颅脑损伤模型:用 10% 水合氯醛对大鼠行腹腔注射麻醉(3 ml/kg 体重),麻醉生效后用碘伏消毒顶部头皮,沿中线切开并分离头皮,用空心钻在矢状缝右侧 3 mm、人字缝前侧 3 mm 处钻一直径 7 mm 的颅骨骨窗,保持硬膜完好。以 20 g 砝码从 40 cm 高处下落撞击置于骨窗上的铁块,造成右顶叶脑挫伤。假手术组采用与致伤组相同的方法制作颅骨骨窗,但不进行自由落体打击。实验操作完成后用骨蜡封闭大鼠颅骨骨窗,预防感染,缝合头皮后置于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、安静、清洁的环境中,清醒后常规饲养。致伤组分别于伤后不同的时相点(1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h)采用颈椎脱臼法处死大鼠,取出脑组织,沿挫伤灶中央作冠状切面取材,所取检材分为两份。一份组织立即于液氮中冷冻保存以进行荧光定量 PCR 检测;另一份用 40 g/L 的多聚甲醛固定。

1.5 HE 染色

根据牛红星等^[9]方法对多聚甲醛固定的脑组织检材经包埋、切片后 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片过夜。片子经脱蜡及水化后,使用苏木素-醇溶性伊红染色、封片, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min 后显微镜观察并拍照。

1.6 大鼠 EPOR 基因 mRNA 在颅脑损伤后的表达分析

取材后参照总 RNA 提取试剂盒的说明提取总 RNA。将 RNA 反转录成 cDNA 后稀释 5 倍做 real-time PCR 实验模板, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。大鼠 EPOR 基因 real-time PCR 上下游特异引物序列分别为:5'-CTGG-GAGGAAGCGGCGAACT3'和 5'-GCGGTGGTACGAGGAGAT3'。内参基因为 β actin,上下游引物分别为:5'-GAGGGAAATCGTGCGTGAC3'和 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG3'。EPOR 和 β actin 的扩增长度均为 200 bp 左右。采用 SYBR 荧光染料进行三步法程序,real-time PCR 反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。Real-time PCR 程序中退火温度为 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$,延伸时间为 40 个循环。在 ABI7900HT 型荧光定量 PCR 仪上运行并重复 3 次实验后利用“ABI PRISIM 7900HD SDS”软件进行半定量数据分析并计算标准差。实验数据处理根据 EPOR 和 β actin 的 Ct(cycle of threshold)值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算。各组实验中,均将阴性对照组 EPOR 的表达量设定为 1。

2 结果与分析

2.1 大鼠 EPOR 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

通过巢式 PCR 反应后,获得明亮清晰的专一条带(图 1),将产物纯化后进行 T-A 克隆后,获得大鼠 EPOR 基因全长 ORF。大鼠 EPOR 全长 ORF 共 1 524 bp,编码 507 个氨基酸,推测其相对分子质量为 55.48 ku,等电点 5.07。应用“SMART”工具分析,大鼠 EPOR 蛋白在 37~139 氨基酸残基位点存在一个“促红细胞生成素受体-配体结合”结构域。在 144~277 氨基酸残基位点存在一个“III 型纤维结合素”结构域。在 250~272 氨基酸残基位点存在一个跨膜结构域(图 2)。应用“TMHMM”工具分析证实了 EPOR 跨膜结构域的存在(图 3)。

2.2 哺乳动物 EPOR 蛋白的系统进化分析

应用 MEGA 生物学软件,获得了哺乳动物 EPOR 蛋白系统进化树(图 4)。通过对系统进化树进行分析,发现物种进化趋势与 EPOR 蛋白进化趋势一致。啮齿类动物 EPOR 蛋白首先聚类到一起。人与大鼠 EPOR 蛋白的同源性达到 82%。

2.3 HE 染色结果观察

应用生物显微镜在 10×40 倍率下进行观察,对照组见神经元的形态结构清晰,细胞核蓝染,呈圆形或椭圆形,核仁明显。致伤组大鼠脑组织挫伤区蛛网膜下腔出血明显,可见大量红细胞聚集,神经细胞肿胀、坏死,

尼氏小体消失,可见神经细胞核不同程度溶解,周围脑组织水肿(图5).不同时相点致伤组大鼠 HE 染色观察无明显差异.

2.4 大鼠 EPOR 基因在颅脑损伤中的表达

Real-time PCR 结果显示,大鼠颅脑损伤后 24 h 内,EPOR 基因 mRNA 表达量持续上升,经 SPSS 统计分析,与对照组相比,EPOR 表达上调具有显著性($P < 0.01$),在损伤后 24 h 达到顶峰,为对照组的 6 倍.假手术组大鼠 EPOR 基因表达无显著性变化(图 6).

3 讨论

EPOR 蛋白在哺乳动物中的同源性较高,甚至鱼类 EPOR 蛋白与哺乳动物也有 60% 以上的同源性.而且不同物种 EPOR 蛋白均有一个共同的“促红细胞生成素受体-配体结合”核心结构域,该结构域用于结合促红细胞生成素,通过“JAK2/STAT5”信号通路诱导成红细胞的增殖.高度同源蛋白暗示了其功能的单一性,即 EPOR 作为原始功能蛋白在进化中得以保留,从鱼类到哺乳动物中,EPOR 承担了相似的生物学功能.颅脑损伤后损伤时间的推断是法医学研究的重点和难点问题,对刑事侦查工作具有重要的意义,近年来在法医病理学领域,对颅脑损伤时间推断的研究已从大体形态学改变发展到细胞、分子和基因水平.TBI 已成为发达国家青少年致残和死亡的重要原因之一^[10-11],在暴力性案件中,颅脑损伤所占的比例较大,准确推断 TBI 后的损伤时间对于准确划定侦查方向和范围具有重要的意义.由于颅脑损伤后形态学的改变出现时间较晚,特征性检验指标难以量化等原因,以损伤后病理形态学改变为基础的传统损伤时间推断的准确性较差.大量的实验和研究证实,颅脑损伤后脑组织中部分生物酶活性、神经递质浓度、细胞因子含量、相关基因表达的变化具有一定的时间规律,这些生物学特征为早期脑损伤时间推断的研究提供了理论依据.

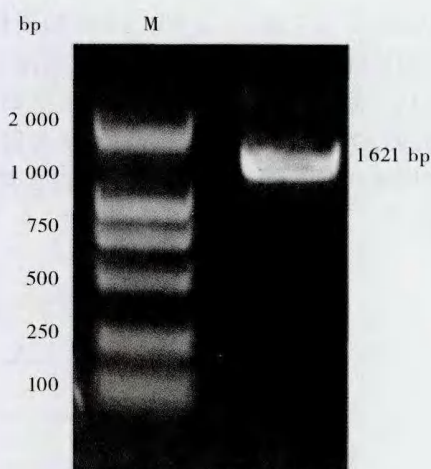


图1 大鼠EPOR基因全长ORF克隆

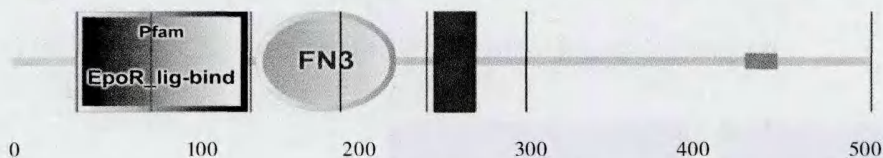


图2 大鼠EPOR蛋白序列结构图

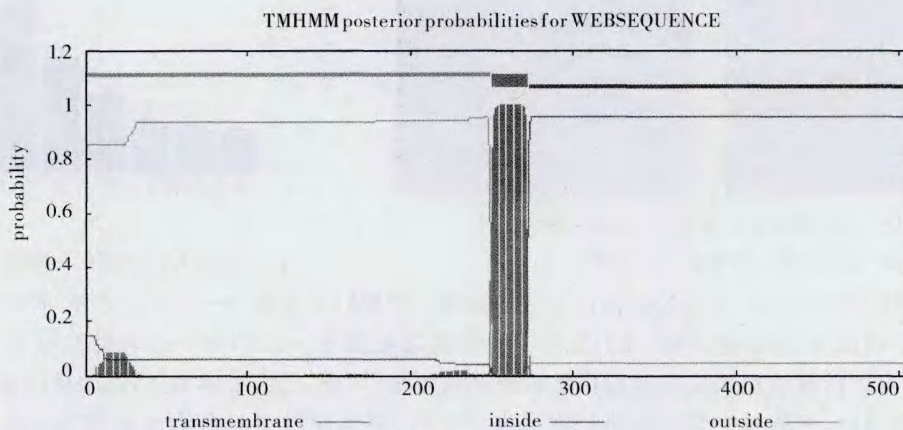


图3 大鼠EPOR跨膜结构域分析

正常人体内 EPOR 水平很低,EPOR 的产生与 TBI 密切相关,EPO 在缺血再灌注、缺血缺氧、蛛网膜下腔出血、脑损伤、脊髓损伤等实验模型中通过 EPOR 发挥神经保护功能.目前的研究多集中于探讨 EPOR 在

TBI后的生物学效应,为EPO在颅脑损伤的临床治疗提供理论支持^[12-13].但EPOR在TBI后的表达与法医学损伤时间的相关性研究少有文献报道.本研究经实时定量PCR分析,TBI后EPOR相对表达量随TBI后损伤时间的延长呈现规律性变化,有助于明确EPOR在脑损伤后的生物学效应,可以作为早期损伤时间推断的参考依据.同时本研究发现人与鼠的EPOR有82%的同源性,高度同源性暗示两物种EPOR蛋白具有相同或相似的功能.以大鼠为脑损伤模型的研究结果也为寻找最佳的人脑损伤时间推断方法提供理论依据.

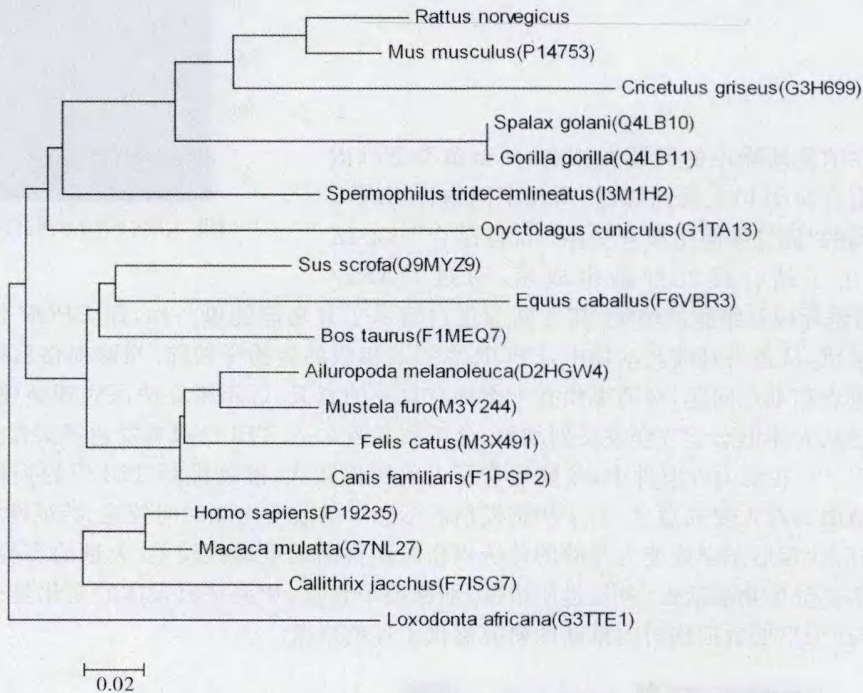
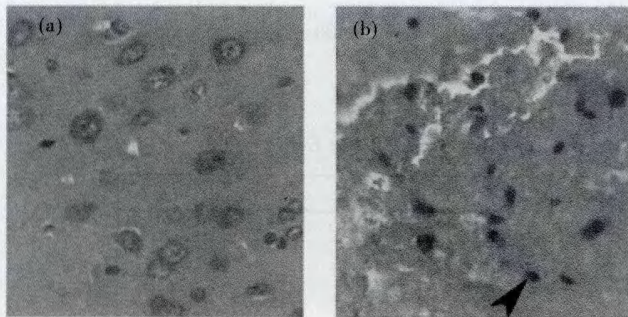


图4 EPOR蛋白系统进化分析(括号内为各物种EPOR蛋白在expasy网站的编号)



(a)对照;(b)颅脑损伤组织,箭头所示为阳性核固缩

图5 大鼠脑组织HE染色结果(10×40)

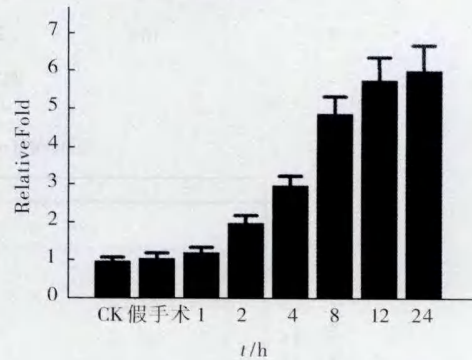


图6 大鼠EPOR基因在颅脑损伤后的表达

机体损伤时调节EPOR表达的机制尚未完全明确,参考相关文献^[4-15],EPOR的表达可能与由低氧诱导转录因子(HIF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子、NO等因素相关.本研究通过自由落体造成大鼠颅脑损伤见神经细胞肿胀、坏死,尼氏小体消失,细胞核溶解,脑组织水肿,局部蛛网膜下腔出血,可通过生化传导路径激活炎症反应、氧化应激引起血管通透性和细胞兴奋性毒性升高,导致脑细胞死亡加剧,低氧面积增加,甚至全脑损伤^[16],组织的低氧状态可刺激EPOR的表达上调.

参 考 文 献

- [1] Lu D, Mahmood A, Qu C, et al. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(9):1011-1017.
- [2] Chong Z Z, Shang Y C, Mu Y, et al. Targeting erythropoietin for chronic neurodegenerative diseases[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(6):707-720.
- [3] Broxmeyer H E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(2):205-208.
- [4] Li J, Wei Q, Zuo G W, et al. Ginsenoside Rg1 induces apoptosis through inhibition of the EpoR-mediated JAK2/STAT5 signalling pathway in the TF-1/Epo human leukemia cell line[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6):2453-2459.
- [5] Miljus N, Heibeck S, Jarrar M, et al. Erythropoietin-mediated protection of insect brain neurons involves JAK and STAT but not PI3K transduction pathways[J]. *Neuroscience*, 2014, 258(31):218-227.
- [6] Sims B, Clarke M, Njah W, et al. Erythropoietin induced neuroprotection requires cystine glutamate exchanger activity[J]. *Brain Res*, 2010, 1321:88-95.
- [7] Cho YK, Kim G, Park S, et al. Erythropoietin promotes oligodendrogenesis and myelin repair following lysolecithin-induced injury in spinal cord slice culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2):753-759.
- [8] 张荣军, 游 潮, 蔡博文, 等. Feeney 法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12):1015-1018.
- [9] 牛红星, 余 燕, 王艳梅, 等. 长耳鸮 *Asio otus* 消化系统形态组织学观察[J]. *河南师范大学学报:自然科学版*, 2005(4):114-117.
- [10] Parikh S, Koch M, Narayan R K, et al. Traumatic brain injury[J]. *Int Anesthesiol Clin*, 2007, 45(3):119-135.
- [11] Heegard W, Birons M. Traumatic brain injury[J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2007, 25(3):655-678.
- [12] Talving P, Lustenberger T, Kobayashi L, et al. Erythropoiesis stimulating agent administration improves survival after severe traumatic brain injury: a matched case control study[J]. *Ann Surg*, 2010, 251(1):1-4.
- [13] 廖正步, 支兴刚, 石全红. 促红细胞生成素及其受体在脑外伤后的表达及意义[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(23):2243-2246.
- [14] Rabie T, Marti H H. Brain protection by erythropoietin: a manifold task[J]. *Physiology*, 2008, 23(5):263-274.
- [15] Chen Z Y, Wang L, Asavaritkrai P, et al. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(14):3180-3188.
- [16] Liao Z B, Zhi X G, Shi Q H, et al. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats[J]. *Eur J Neurol*, 2008, 15(2):140-149.

Cloning and Expression Analysis of Rat Erythropoietin Receptor in Brain Injury Model

LI Wei, QI Lin

(Railway Police College, Zhengzhou 450053, China)

Abstract: A full length cDNA of rat erythropoietin receptor gene was isolated by nest PCR method. The ORF of EPOR was 1 524 bp, encodes 507 amino acid residues. The deduced molecular weight and PI was 55.48 ku, and the isoelectric point was 5.07. The realtime PCR result indicated that the expression level of EPOR was enhanced during the early time in rat traumatic brain injury (TBI) model. The EPOR expression level of 24 h after TBI reached to the peak during the TBI period, and the expression amount was 6 times of the control.

Keywords: rat; traumatic brain injury; erythropoietin receptor; real-time PCR