

中华医学会系列杂志

ISSN 0254-9026

CN 11-2225 / R

中华老年医学杂志®

ZHONGHUA LAONIAN YIXUE ZAZHI

2003年3月 第22卷 第3期



CHINESE JOURNAL OF GERIATRICS

Volume 22 Number 3
March 2003



中华医学会
CHINESE
MEDICAL
ASSOCIATION

ISSN 0254-9026



中华老年医学杂志[®]

CHINESE JOURNAL OF GERIATRICS

月刊 1982年2月创刊 第22卷 第3期 2003年3月14日出版

主管
中国科学技术协会

主办
中华医学会
100710,北京市东四西大街42号

编辑
中华老年医学杂志编辑委员会
100730,北京市大华路1号
电话:0086-10-65132266-3892
传真:0086-10-85111151
Email:cmaln@public.sti.ac.cn
http://www.cmaph.com.cn/zhlnyx

总编辑
王新德

编辑部主任
于普林

出版
卫生部北京医院
100730,北京市大华路1号

广告代理
北京世纪印象广告公司
100052,北京市宣武区香炉营头条
33号院2号楼丝绸商务310室
电话(传真):0086-10-63168006

广告经营许可证
京东工商广字0133号

印刷
北京印刷三厂

发行
国内:北京报刊发行局
国外:中国国际图书贸易总公司
(北京399信箱,100044)
代号BM635

订购
全国各地邮电局
邮发代号2-57

邮购
中华老年医学杂志编辑部
100730,北京市大华路1号
电话:0086-10-65132266-3892
传真:0086-10-85111151
Email:cmaln@public.sti.ac.cn

定价
每期8.60元,全年103.20元

中国标准刊号
ISSN 0254-9026
CN 11-2225/R

2002年版版权归中华医学会所有

本刊刊出的所有文章不代表中华医学
会和本刊编委会的观点,除非特别
声明

本刊如有印装质量问题,请向本刊编
辑部调换

目次

临床研究

- 线粒体DNA ND1基因 nt3394T→C突变
与老年人2型糖尿病 于珮 于德氏 刘德敏 133
- 老年2型糖尿病患者内皮依赖性舒张功能
及颈、股动脉粥样硬化的研究 苏琳 苗懿德 孙立新等 136
- 老年人真胰岛素、胰岛素原水平及
β细胞功能的变化 杨静 黎明 吴从愿等 140
- 老年前期及老年人胸部结节病的
CT表现 顾占军 潘纪成 于经瀛 143
- 老年下呼吸道感染患者肺炎克雷伯菌和
大肠埃希菌耐药性分析 赖国祥 林庆安 黄梁洪等 146
- 多梗死性痴呆患者血浆、脑脊液胰岛素含量
与智能水平的关系 周红杰 王景周 高东等 150
- 中老年非痴呆患者海马区阿尔茨海默样
病理改变的分析 张景华 王鲁宁 何祥 153
- 老年非瓣膜心脏病心房颤动患者血小板
功能及血管性血友病因子的改变 ... 杨杰孚 王华 许晓东等 156
- 老年白内障患者超声乳化吸除联合人工
晶状体植入术后生存质量的变化 ... 刘杰为 许京京 何明光 159

基础研究

- 诱生型一氧化氮合酶在老年豚鼠
耳蜗的表达 熊敏 何青莲 汪建等 162
- 辛代他汀对兔粥样硬化髂动脉P-选择素、
细胞间粘附分子-1表达的影响 季彦 张瑞岩 陆国平等 165
- RNA指纹法分离血管性痴呆大鼠海马内
的差异表达基因 张雪朝 孙国杰 169

技术与方法

- 定量RT-PCR方法检测衰老大鼠肾脏
PAI-1基因的表达 吕杨 洪权 陈香美等 172

RNA 指纹法分离血管性痴呆大鼠海马内的差异表达基因

张雪朝 孙国杰

【摘要】 目的 分离血管性痴呆(VD)大鼠海马内疾病相关基因。方法 用改良的 Pulsinelli 4-血管阻断全脑缺血法 4-VO 法建立 VD 模型, Morris 水迷宫检测其痴呆, 以 RNA 指纹法对比正常老龄大鼠和血管性痴呆大鼠海马组织基因表达, 并分离疾病情况下表达差异的基因。结果 在成功建立 VD 大鼠模型的基础上, 分离、筛选、克隆到 32 条 VD 海马内疾病相关差异表达基因片段, 选取 2 条 VD 特异表达的片段进行 Northern 杂交验证, 通过测序并与 GenBank 比较证实均为新基因片段, 登录号为 BG937392、BG937393。结论 RNA 指纹法是快速、简便、有效的分离差异基因的方法, 本实验分离的差异表达基因可能是直接参与疾病发生、发展过程的致病基因或保护基因。

【关键词】 痴呆, 血管性; 海马; 基因表达

Isolation of differently expressed cDNAs from the hippocampus of rats with vascular dementia by RNA fingerprinting ZHANG Xue-zhao, SUN Guo-jie. Department of Acupuncture, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061

【Abstract】 **Objective** To isolate differently expressed cDNAs associated with vascular dementia from hippocampus of rats. **Methods** The creation of vascular dementia model of rat was by 4-vessel occlusion method. The learning and memory of vascular dementia (VaD) rats were examined by Morris water maze. RNA fingerprinting was used to analyse the differently expressed cDNAs in the hippocampus of normal aging and VaD rats. At the same time, cDNAs expressed differently during the progression of VaD were isolated. **Results** Thirty-two candidate cDNA fragments were isolated by RNA fingerprinting. The two cDNA fragments specifically expressed in VaD rats were analysed by Northern blot. Homology analysis through BLAST revealed that these two were novel genes and were given numbers of BG937392 and BG937393 in the gene bank. **Conclusions** RNA fingerprinting is a simple and quick method for isolating differently expressed genes. These two new gene fragments may contribute significantly to the process of VaD as pathogenic genes or protective genes.

【Key words】 Dementia, vascular; Hippocampus; Gene expression

血管性痴呆(VD)是指各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征, 表现为记忆力、计算力、判断力、注意力、抽象思维能力、语言功能减退^[1]。我们过去的实验^[2]以及文献报道证实, VD 发病与一些基因表达的变化有关。基于 RNA 指纹法可筛选低丰度表达的差异基因, 且所需起始材料少, 假阳性率低, 特别是它可以比较两组以上的 RNA 样本, 故此我们于 2000 年 5 月至 2001 年 5 月用 4-血管阻断全脑缺血法定 4-VO 建立老年大鼠 VD 模型, 用 Morris 水迷宫检测其学习记忆障碍, 而后用 RNA 指纹法筛选、克隆并鉴定海马组织中与 VD 大鼠模型相关的基因。

材料与方 法

一、动物及取材

雄性 SD 大鼠, 480~520 g, 对照组、VD 组各 10 只。VD 组大鼠于 4-VO 术后 15 d 与对照组同期取材, 断头处死, 迅速取脑, 置冰上分离海马, 称重, 置 -70℃ 保存、备用。所用大鼠由上海中医药大学动物中心提供。

二、VD 模型的制备

采用改良的 4-VO 建立 VD 大鼠模型^[3]。

三、行为学检测

术后第 10 d 按照相关文献^[4]进行 Morris 水迷宫痴呆检测。

四、总 RNA 提取及鉴定

根据总 RNA 提取试剂盒 (Ambion 提取试剂

基金项目: 贵州省教委 2000 年度科研基金 (黔教高 200012), 贵州省省长基金 (S2000-9) 资助

作者单位: 430061 武汉湖北中医学院针推系

盒,US)说明书,采用异硫氰酸胍一步法^[5]提取海马组织中总 RNA。单链 cDNA 的合成根据试剂盒(delta differential display kit, CLONTECH)说明书操作。RNA 指纹法在 20 μ l 反应体系中,加入 cDNA 1 μ l、上述试剂盒提供的 T 及 P 引物各 1 μ l、10 \times Klen Taq 酶缓冲液 2 μ l, dNTP (5 mM) 0.2 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (1 000-3 000 Ci/mM) 0.2 μ l、Advantage KlenTaq 酶混合液 (50 \times) 0.4 μ l, 在 PTC-100 型(MJ, US) PCR 扩增仪上,按下列条件进行反应:第一循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。然后,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 进行两个循环。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 进行 25 个循环。反应结束后 68 $^{\circ}\text{C}$ 延长 7 min。引物碱基序列:T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA-3', T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTT TTTTTTAC-3', P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAA TGCTGGGA-3', P2: 5'-ATTAACCCTCACTAA ATCGGTCATAG-3'。

五、聚丙烯酰胺变性凝胶电泳及放射自显影

用 6% 的聚丙烯酰胺/8M 尿素变性凝胶,在 70 W 恒功率电泳 2.75 h,后将胶固定于 3 MM 滤纸上,在干胶机上 80 $^{\circ}\text{C}$ 真空抽干 40 min。用快屏 X 光盒(Kodak BioMax MR)压片,于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影。

六、差别条带的回收和再扩增

从凝胶上切割下差异条带,按凝胶电泳产物纯化回收试剂盒(Mobio 公司)说明回收差别条带。将下列组分混合于 0.5 ml PCR 反应管中:3.5 μ l 上述 DNA 提取液,2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液,0.25 μ l 5 mM dNTP,1.25 μ l 差别条带相对应的 T 引物,1.25 μ l 差别条带相对应的 P 引物,0.5 μ l Advantage Klen Taq 酶混合液 (50 \times)。在 PTC-100 型(MJ) PCR 扩增仪上,按下列条件进行再扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 进行 20 个循环。

七、PCR 产物的回收、克隆及酶切鉴定

将扩增产物进行琼脂糖电泳,按 Mobio 公司试剂盒说明进行回收,然后直接与 p-GEM-T 连接。同时转化 JM109 菌株,铺 Amp+LB 板,待长出菌斑后,从培养平板上蓝白菌落中挑选一个白色菌落,摇菌,少量提取质粒(QIAGEN 公司质粒抽提盒, German)。取上述质粒利用 p-GEM-T 载体上的单酶切位点 Apol 和 PstI 进行双酶切鉴定所

需的阳性克隆。

八、Northern Blot 筛选显示 cDNA 片段

取 20 μ g RNA 变性后,于 1% 甲醛变性凝胶电泳。用毛细管法转移 RNA 至尼龙膜(B. M. US)。用 Promega 公司随机引物标记探针试剂盒,将 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP 分别掺入到上述片段中,制成 cDNA 探针。杂交体系为 5 μ l 5 \times buffer, 1 μ l 未标记的 dNTPs, 30 ng 变性的 DNA 模板(于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min), 1 μ l BSA, 2~3 μ l $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP, 1 μ l Klenow 酶, 5 μ l EDTA, 43 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 16~20 h。严谨条件下洗膜后,将尼龙膜用两张底片夹起,放入带增感屏的暗盒中 -70 $^{\circ}\text{C}$ 曝光 1~2 d, 将底片晾干后扫描。最后用 GADPH 片段探针与膜杂交,作为内参照。

九、序列测定和分析

用全自动荧光测序仪对酶切鉴定的阳性克隆进行测序。然后通过 Internet 的 Gene Bank 对阳性的 ESTs 进行同源性比较和序列分析并对未知的 ESTs 登录注册。

结 果

一、Morris 水迷宫痴呆检测

VD 组和对照组差异有显著性 ($P < 0.01$)。以对照组大鼠逃避时间的均值为参考值,计算实验组大鼠各组各时间段成绩的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏时间的比例,该值 $> 20\%$ 定为痴呆鼠。筛选出痴呆鼠 8 只用于进一步实验。

二、RNA 的鉴定

海马组织总 RNA 甲醛凝胶变性电泳上可清晰看到 RNA 28S 和 18S 两条带,其亮度比值约为 2:1,并隐约可见 5S 条带,表明 RNA 完整,没有降解,符合实验要求,见图 1。通过紫外分光光度计检测样品 RNA 的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值,两者比值在 1.70~2.00。

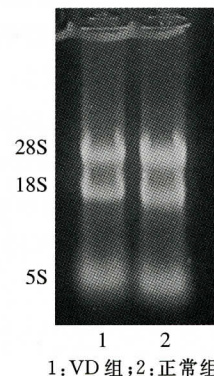
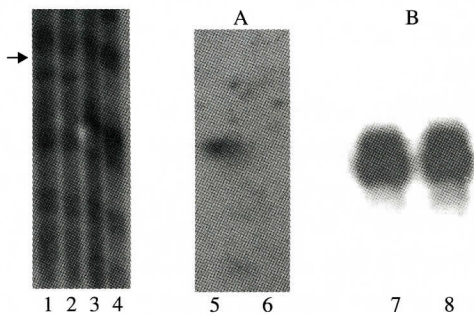


图 1 RNA 凝胶电泳

三、VD 大鼠海马的 mRNA 的差别显示

以来自同一样本的不同浓度(1:10;1:40)的 cDNA 模板具有相同差异的条带为标准,在相同的背景条件下比较同一位置上的两组大鼠海马有差异的条带。初步筛选到 32 条差别条带,见图 2。经过回收和再扩增,选取在 VD 组特异性表达的 2 条单一条带进行克隆。挑选单一白色菌落,扩增后提取质粒,酶切电泳,证实 2 个重组子的插入片段均与目的片段大小一致。经 Northern Blot 验证,见图 2,差异片段得到证实,分别命名为 VD2、VD5。



1:VD 组 1:10;2:VD 组 1:40;3:正常组 1:10;4:正常组 1:40;5:VD 组 VD2 基因;6:正常组 VD2 基因;7:VD 组 GADPH 内参照;8:正常组 GADPH 内参照;箭头示:新基因片段

图 2 RNA 指纹法凝胶电泳

四、差别片段的序列分析

将 2 条有意义的差异片段用自动测序仪进行测序。

五、生物信息学分析将序列通过 Internet 与 GENBANKDATABASE 进行同源比较(Blast)

VD2、VD5 未发现同源基因,为新的 ESTs 片段,此两条序列已在 GENBANKDATABASE 登录,登录号分别为:BG937392、BG937393。其序列分别为:(1)VD2 片段大小为:398bp;(2)VD5 片段大小为:210 bp

讨 论

本实验在 VD-大鼠模型上成功地建立了 RNA 指纹法,分离出数十条血管性痴呆大鼠模型疾病相关基因,将 VD 特有的差异基因 2 条进行菌落阳性筛选、克隆,进一步进行 Northern Blot 鉴定并得到证实。通过序列测定后与 Gen Bankdatabase 比较,未发现与本片段同源序列,提示可能是未知基

因,分别命名为 VD2、VD5,登录号为 BG937392、BG937393。这两个疾病相关基因可能是直接参与疾病发生发展过程的致病基因或保护基因。VD2、VD5 在体内其它部位的表达、基因 cDNA 全长序列以及其对应蛋白质的结构和功能我们正在做进一步研究。另外,实验中还在 VD 模型海马内发现了一些与 VD 疾病相关的上、下调基因片段,这些基因片段可能在 VD 发生、发展过程中有着十分重要的意义,我们现在正在对其进行分类、整理和鉴定。

目前对 VD 的研究多限于 8 d 内的短期观察,缺乏较长期的深入研究。海马是其研究涉及最多的结构,它是缺血损伤最敏感脑区,而且直接参与信息贮存和回忆。本实验在研究痴呆大鼠海马内基因的变化前首先进行了 4-VO 手术 15 d 后大鼠学习记忆情况的观察。Volpe 等^[6]在 1984 年就通过实验证实,4-VO 造成的全脑缺血所致的痴呆与人类临床脑组织缺血缺氧所致痴呆相似,而且,它造成的学习记忆障碍是永久的,不可自行痊愈的。4-VO 后的学习记忆成绩能做为成功建立 VD 模型的客观指标^[7]。本实验中 4-VO 手术 15 d 后 Morris 水迷宫成绩显示,4-VO 导致大鼠明显的空间参考记忆障碍,同时出现简单工作的障碍,这与近年其他实验研究结果一致^[8]。

参 考 文 献

- 1 张雪朝. 针刺对血管性痴呆临床治疗及其机理的研究进展. 华夏医学, 2000, 13: 556-558.
- 2 张雪朝, 吕明庄, 贺志光, 等. 针刺改善 VD 大鼠记忆障碍及 c-fosmRNA 和蛋白的表达. 中国康复医学杂志, 2001, 16: 74-77.
- 3 张雪朝, 肖茂磊, 蔡文琴, 等. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与神经型一氧化氮合酶表达的关系. 解剖学杂志, 2001, 24: 340-343.
- 4 赵宪林, 房宝玉, 方秀斌, 等. 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的研究. 中国医科大学学报, 2000, 20: 264-266.
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloro form extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159.
- 6 Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J, et al. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischaemia. Stroke, 1984, 15: 558-562.
- 7 贾健民, 贾健平. 大鼠全脑反复缺血再灌注长期生存模型及行为学研究. 中风与神经疾病杂志, 1992, 9: 71-73.
- 8 Wright JW, Clemens JA, Panetta JA, et al. Effects of LY231617 and angiotensin IV on ischemia-induced deficits in circular water maze and passive avoidance performance in rats. Brain Res, 1996, 717: 1-11.

(收稿日期:2001-09-17)

(本文编辑:于普林)