

# 大鼠脑组织中胆囊收缩素基因表达与发育的关系

洪燕敏<sup>1</sup>, 杨欣艳<sup>1</sup>, 王学瑞<sup>1</sup>, 宋学文<sup>2</sup>, 吴锐<sup>2</sup>, 郑红<sup>2</sup>, 张镜宇<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070 2. 天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070)

**摘要** 研究 CCK 基因在不同日龄大鼠脑中转录水平上的表达。取出出生后不同日龄 Wistar 大鼠脑组织, 提取总 RNA, 甲醛凝胶电泳, Northern 印迹与  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 标记 CCK cDNA 的探针杂交, 放射自显影后, 经激光扫描测定自显影图中斑点光密度, 以估量 CCK mRNA 表达的相对水平。结果表明, 刚出生的大鼠脑中 CCK 的 mRNA 含量甚低, 随着鼠龄增长, 浓度增高, 20 日龄时 CCK mRNA 浓度急剧升高, 40 日龄 CCK mRNA 的水平稍降低。CCK 基因在转录水平的表达与个体发育有关。

**关键词**: CCK mRNA, 基因表达, 大鼠

中图分类号: Q344+.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-977X(2001)01-0014-03

## Expression of the Cholecystokinin Gene in Rat Brain during Development

HONG Yan-min<sup>1</sup>, YANG Xin-yan<sup>1</sup>, WANG Xue-rui<sup>1</sup>, SONG Xue-wen<sup>2</sup>,  
WU Rui<sup>2</sup>, ZHENG Hong<sup>2</sup>, ZHANG Jing-yu<sup>2</sup>

(1. Fundamental Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070;

2. Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** In this paper the clone was used as probe to study its expression for revealing the relationship between the level of CCK mRNA and the brain development. Total RNA from Wistar rats of various stages of development was isolated by acid guanidinium-thiocyanate phenol-chloroform extraction, followed by formaldehyde gel-electrophoresis. Northern blot, hybridization with a<sup>32</sup>P-labeled CCK cDNA probe, autoradiography and quantitation were performed by the laser density scanning. It was concluded from the results that the quantities of CCK mRNA in rat brain increased during development. From those mentioned above, it can be said that brain CCK mRNA may serve as a marker for the brain development.

**Key words**: cholecystokinin mRNA, gene expression, rat

胆囊收缩素(CCK)是一种存在于消化道和脑中的脑肠肽,最早是从猪的小肠中提出的,由 33 个氨基酸组成的多肽。以后又发现了由 39 个氨基酸、58 个氨基酸及 8 个氨基酸组成的不同分子形式的 CCK,其中 CCK-8 是最具有活性的物质,在脑中含量丰富。主要作用是促进胆囊收缩及胰酶分泌,还可作为神经递质或神经调质(neuromodulator),在维护机体正常生理功能方面起着重要作用。1983 年,

Ichihara 等对大鼠脑中免疫活性 CCK(iCCK)的个体发生进行过研究,发现 iCCK 的含量与脑的正常发育是同步的<sup>[1,2]</sup>。为了从基因水平了解上述变化的分子机理,我们采用分子克隆技术<sup>[3~5]</sup>,研究 CCK 基因在不同鼠龄脑组织中的表达,观察 CCK 基因在转录水平存在的规律,有助于阐明 CCK 基因表达调控的分子机理。

收稿日期: 2000-01-20; 修回日期: 2000-03-29

作者简介: 洪燕敏(1963-),女,上海人,硕士学位,副教授,研究方向为法医分子生物学。Tel: 022-23522636; E-mail: Hongym@public.tpt.tj.cn

本文为硕士学位论文的部分工作,指导教师为张镜宇教授。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 实验动物

Wistar 大鼠由本校实验动物中心提供,分别取出生后 0、1、4、7、8、14、20 及 40 日龄大鼠,断头剥出脑组织,液氮速冻, -80℃ 保存备用。

### 1.2 试剂与仪器

CCK cDNA 由本室克隆<sup>[6]</sup>, Nick Translation 试剂盒购自 Promega 公司,其他化学试剂均为进口或国产分析纯。Centrifuge 17RS 台式冷冻离心机及 Centrifuge 22RS 高速冷冻离心机均为德国 Heraeus 公司产品,恒温恒流电泳仪 2002、紫外透射仪、亚室温恒温水浴均为瑞典 LKB 公司产品,紫外分光光度计为 PE 公司产品。

### 1.3 鼠脑总 RNA 的提取

取出生后不同日龄 Wistar 大鼠各 5 只,断头取脑,将同一日龄鼠脑混合在一起匀浆,用硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总 RNA<sup>[7]</sup>。紫外分光光度检测 RNA 质量和浓度,各取 10 $\mu$ g RNA 样品,进行甲醛凝胶变性电泳及印迹法分析<sup>[8]</sup>。

### 1.4 CCK 基因探针的制备

CCK 基因在质粒 pUC 上重组<sup>[6]</sup>,质粒经转化、摇菌、扩增、纯化、用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切及透析袋电洗脱法回收 CCK 基因探针<sup>[5]</sup>,溶于 dH<sub>2</sub>O 水中,备用。

### 1.5 CCK 探针标记及与膜的杂交

应用切口平移(nick-translation system)<sup>[9]</sup>标记 CCK 基因探针,经 Sephadex G-50 纯化,于 100℃ 水浴中 10 分钟后,迅速放入冰浴中备用。将尼龙膜用 5 $\times$  SSC 浸湿,放入杂交袋中,加入预杂交液(50% 甲酰胺,1% SDS,10% 硫酸葡聚糖(dextran sulfate),200mg/L 鲑精 DNA)42℃ 保温 2 小时。将标记的探针放入杂交袋中,42℃ 过夜。杂交后洗膜,先用 2 $\times$  SSC 在室温下洗一次;再在 60℃ 下用 2 $\times$  SSC、1% SDS 洗两次,0.2 $\times$  SSC、0.1% SDS 洗一次。放射自显影 6 天。

### 1.6 光密度扫描测定

用 LKB 激光密度扫描仪测定放射自显影图中斑点的光密度,以扫描的积分面积表示显影的相对强度,反映即 CCK mRNA 的相对水平。

提取总 RNA,分光光度计测得  $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ ,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,28S:18S RNA 亮度为 2:1,说明 RNA 样品无降解,也无 DNA、蛋白及酚污染。

### 2.2 回收探针的鉴定

pUC-CCK 质粒提取及纯化后,透析袋电洗脱法回收 CCK cDNA,以 pBR322/*Hin*II 作分子量标准,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,在 320bp 左右得到一条清晰条带(见图 1)。

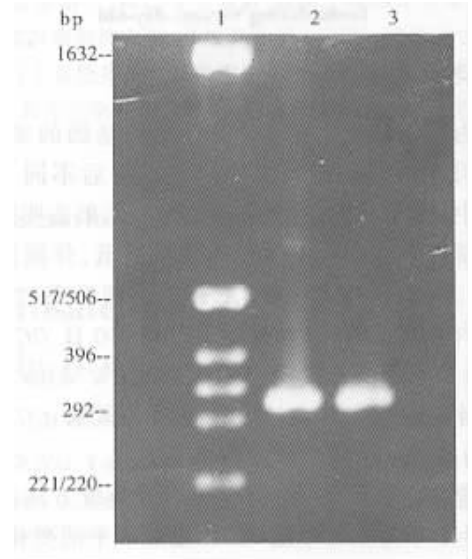


图 1 回收 CCK cDNA 探针鉴定

1. 核酸分子量参照物(pBR322/*Hin*II) 2. 3. CCK cDNA 探针。

Fig. 1 Identification of recovery CCK cDNA probe

1. pBR322/*Hin*II Marker 2. 3. CCK cDNA probes.

### 2.3 CCK mRNA 的表达

采用 Northern 印迹方法,经杂交、放射自显影,得到不同日龄大鼠脑中 CCK mRNA 的变化(见图 2),激光密度扫描测定结果(见表 1)。

表 1 CCK mRNA 激光密度扫描值

Table 1 CCK mRNA of quantitation was performed by the laser density scanning

日龄(日)	积分面积相对值
0	0.113
1	0.148
4	0.241
7	0.380
8	0.383
14	1.130
20	3.020
40	2.561

## 2 结 果

### 2.1 不同发育阶段鼠脑总 RNA 纯度的鉴定

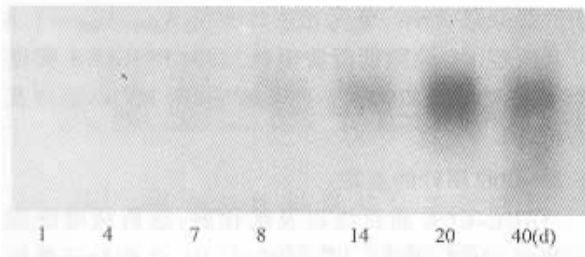


图2 不同日龄大鼠脑组织 *CCK* mRNA 表达

Fig.2 Expression of *CCK* mRNA in rat brain during various day-old

### 3 讨论

为了从分子水平上了解 *CCK* 基因的变化,我们采用 Northern 印迹方法研究出生后不同日龄大鼠脑中 *CCK* mRNA 的表达情况。结果表明刚出生的大鼠脑中 *CCK* mRNA 的含量甚低,伴随鼠龄的增长,其脑内 *CCK* mRNA 含量逐渐升高,20 日龄鼠脑内 *CCK* mRNA 浓度达到高峰,40 日 *CCK* mRNA 量又稍降低。说明自出生起 *CCK* mRNA 即已在脑神经细胞中有表达。这表明大鼠脑 *CCK* mRNA 的基因转录与个体发育有关。

曾有许多作者<sup>[1,2,10]</sup>应用放射免疫方法测定大鼠出生后个体发育中脑内 *CCK* 蛋白水平的变化,与我们测得的 *CCK* mRNA 的变化结果一致。*CCK* 基因表达在转录水平,同在蛋白质水平的结果是一致的。

在实验中,我们未找到一个其 mRNA 表达水平较高,又不受大鼠生长日龄影响的参考标准用于校正各泳道的上样误差。因此采用总 RNA 电泳后,

用 28S RNA 的荧光度为参考标准。

### 参考文献 (References):

- [1] Ichihara K, Eng J, Yalow R S. Ontogeny of molecular forms of *CCK* - peptides in rat brain and gut [J]. Life Sci, 1984, 34: 93 ~ 98.
- [2] Ichihara K, Eng J, Yalow R S. Ontogeny of immunoreaction *CCK*, *VIP* and *secretin* in rat brain and gut [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983, 112(3): 891 ~ 898.
- [3] Takeda K, Koshimoto H, Uchiyama F, et al. Postnatal development of cholecystokinin-like immunoreactivity and its mRNA level in rat brain regions [J]. Journal of Neurochemistry, 1989, 53: 772 ~ 778.
- [4] Giardino L, Bettelli C, Pozza M, et al. Regulation of *CCK* mRNA expression in the rat brain by stress and treatment with sertraline, a selective serotonin re-uptake inhibitor [J]. Brain Res, 1999, 824(2): 304 ~ 307.
- [5] Holland K L, Norby L A, Micevych P E. Peripubertal ontogeny and estrogen stimulation of cholecystokinin and preproenkephalin mRNA in the rat hypothalamus and limbic system [J]. J Comp Neurol, 1998, 392(1): 48 ~ 576.
- [6] 宋学文, 赵崇, 邓彤, 等. 大鼠脑前缩胆素原的 cDNA 克隆 [J]. 生物化学杂志, 1996, 12(5): 624 ~ 625.
- [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162: 156 ~ 159.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 367 ~ 369.
- [9] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993, 163 ~ 167.
- [10] Varro A, Bullock A J, Jadarola M J. Regional differences in the development of cholecystokinin-like activity in the brain [J]. Dev Brain Res, 1983, 9: 347 ~ 352.